



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA EM ÉGUAS SUBMETIDAS A INSEMINAÇÃO  
ARTIFICIAL

JULIETA MARIA PEIXOTO CARMONA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Filipe Lopes Costa  
Doutor José Manuel Antunes Ferreira da Silva  
Mestre Nuno Filipe Gomes Bernardes  
Dr. José Carlos Miguéis Nunes Duarte

ORIENTADOR

Dr. José Carlos Miguéis Nunes Duarte

CO-ORIENTADOR

Mestre Nuno Filipe Gomes Bernardes

2011

LISBOA

---



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA EM ÉGUAS SUBMETIDAS A INSEMINAÇÃO  
ARTIFICIAL

JULIETA MARIA PEIXOTO CARMONA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Filipe Lopes Costa  
Doutor José Manuel Antunes Ferreira da Silva  
Mestre Nuno Filipe Gomes Bernardes  
Dr. José Carlos Miguéis Nunes Duarte

ORIENTADOR

Dr. José Carlos Miguéis Nunes Duarte

CO-ORIENTADOR

Mestre Nuno Filipe Gomes Bernardes

2011

LISBOA

---



## **AGRADECIMENTO**

Ao Dr. José Carlos Duarte por ter aceite o meu pedido de orientação, por me ter recebido na Lusopecus Lda. permitindo-me ter o estágio que ambicionava, pela simpatia, pela sua disponibilidade em ajudar-me sempre que necessitei e por todos os ensinamentos.

À Dra. Cristina Cosinha, pela sua extrema simpatia e amizade que tornaram os dias intermináveis de trabalho muito mais alegres, pelo voto de confiança para realização de práticas médico-veterinárias, pela sua paciência e disponibilidade para me transmitir novos conhecimentos durante estes 5 meses de estágio.

À restante equipa da Lusopecus Lda. pela forma como me receberam na sua casa.

Ao Dr. Nuno Bernardes, por ter aceite o meu pedido de co-orientação, pela simpatia, pela disponibilidade e pela ajuda preciosa que me deu na redação desta dissertação.

Ao Dr. Telmo Nunes pelo auxílio no tratamento estatístico dos dados deste trabalho.

Aos meus pais, Elísio e Albertina, por todo o amor, carinho, dedicação, por terem apoiado sempre a minha decisão de abraçar esta maravilhosa profissão e por me desafiarem a ser sempre mais e melhor. Obrigado por fazerem de mim o que sou hoje.

Ao Ricardo, o amor da minha vida, por tudo que passamos juntos, por estar ao meu lado incondicionalmente nos bons e nos maus momentos. Obrigado por me fazeres tão feliz. Amo-te.

À minha querida amiga Andreia Pestanudo, por me provar que a amizade verdadeira supera todos os obstáculos e que por maior que seja a distância que nos separa vai estar sempre presente na minha vida.

A todos aqueles que partilharam comigo esta jornada, especialmente à Sofia Salazar, à Nara França, ao Gonçalo Frouco, à Inês Silva e ao Luís Serrano, pela amizade, companheirismo e todos os bons momentos passados.

## **TITULO: Resposta inflamatória uterina em éguas submetidas a inseminação artificial**

**Resumo:** A inseminação artificial de éguas resulta invariavelmente numa resposta inflamatória uterina transitória e fisiológica cuja função é eliminar o excesso de espermatozóides, plasma seminal, diluidores e microrganismos do lúmen uterino. Esta inflamação é caracterizada por um influxo de polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) para o lúmen uterino. A sua presença e magnitude pode ser diagnosticada através de ecografia uterina transrectal em combinação com citologia, cultura e/ou biópsia endometrial.

São vários os intervenientes neste fenómeno. Os espermatozóides equinos activam o complemento, incitando a quimiotaxia e migração de PMNs para o lúmen uterino. Maiores concentrações espermáticas correspondem a um estímulo quimiotático mais exuberante.

O plasma seminal aparenta possuir tanto a capacidade de suprimir (*in vitro*) como de estimular (*in vivo*) a migração dos PMNs. A sua presença numa dose inseminante reduz a duração da resposta inflamatória uterina após inseminação artificial (IA). Já o papel dos diluidores é ainda desconhecido, mas a sua infusão simples é passível de resultar numa inflamação uterina. Estudos recentes sugerem que a inseminação de doses com 80 mL (volume médio do ejaculado de garanhão) resultam numa maior inflamação uterina.

Contrariamente ao postulado, o sémen congelado por si só, não induz uma maior inflamação que sémen fresco e, aparentemente, a resposta inflamatória uterina obtida após monta natural e IA com sémen fresco ou refrigerado diluído não difere. Não existem também evidências de que a IA intra-cornual profunda cause um maior estímulo inflamatório quando comparada com a IA clássica no corpo uterino ou que o momento da IA influencie a resposta inflamatória uterina por ela despoletada.

O objectivo desta dissertação consistiu em estudar a influência de diversos factores (idade da égua, tipo de sémen, presença de plasma seminal, momento e técnica de IA, e características do útero antes da inseminação, nomeadamente o edema uterino) no estabelecimento da resposta inflamatória uterina após inseminação bem como a sua influência na taxa de concepção. Para tal foram avaliadas 27 éguas (n=27) recorrendo-se à ecografia uterina antes e 24 horas após IA, momento em que se recolheram líquidos de lavagem uterina para citologia.

Neste estudo não foram obtidos resultados estatisticamente significativos que permitam aferir a influência dos parâmetros atrás referidos na inflamação uterina após IA ( $p>0,05$ ) principalmente por este estudo estar condicionado pelo tamanho reduzido da amostra analisada.

**Palavras-chave:** Égua, inflamação, útero, inseminação artificial

## **TITLE: Uterine inflammatory response in mares submitted to artificial insemination**

**Abstract:** Artificial insemination of mares always results in a transient physiological uterine inflammatory response which main function is to remove spermatozoa in excess, seminal plasma, extenders and microorganisms present in the uterine lumen. This inflammation is characterized by an influx of neutrophil polymorphonuclears (PMNs) to the uterine lumen. Its presence and magnitude can be diagnosed by transrectal ultrasonography in combination with uterine cytology, culture and/or endometrial biopsy.

There are several players in this phenomenon. The equine spermatozoa activate complement, which results in chemotaxis and migration of PMNs into the uterine lumen. Higher sperm concentrations correspond to a more exuberant chemotactic stimulus.

Seminal plasma appears to have both the ability to suppress (*in vitro*) and to stimulate (*in vivo*) the migration of PMNs. Its presence in an insemination dose reduces the duration of uterine inflammatory response after artificial insemination (AI). The role of semen extenders is still unknown but its single infusion is likely to result in an inflammation of the uterus. Recent studies suggest that insemination doses of 80 mL (average volume of the stallion ejaculate) result in a greater inflammation.

Contrary to assumption, frozen semen itself doesn't induce a greater inflammation than fresh semen, and apparently there is no difference between the inflammatory response elicited by natural mating as compared to AI with fresh or chilled diluted semen. There is also no evidence that deep horn AI causes a greater inflammatory stimulus compared with the classical AI in the uterine body, or that the time of AI influences the uterine inflammatory response.

The aim of this dissertation was to study the influence of various factors (age of the mare, type of semen, presence of seminal plasma, AI time and technique, and uterine characteristics before insemination, namely the uterine edema) in the establishment and extent of uterine inflammatory response after insemination and its influence on the conception rates. For that, 27 mares (n=27) were evaluated by resorting to uterine ultrasound before and 24 hours after AI, moment when uterine lavage samples were collected for uterine cytology.

This study didn't yield any significant differences for all parameters evaluated that would allow the assessment of the influence of these parameters in uterine inflammation after AI ( $p > 0.05$ ) as this study was mainly conditioned by the small size of the sample.

**Key words:** Mare, inflammation, uterus, artificial insemination

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	V
ÍNDICE DE TABELAS .....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	VII
I – ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO .....	1
II - OBJECTIVO DO TRABALHO .....	4
III – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
1 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL .....	5
1.1 Revisão Histórica .....	5
1.2 Vantagens da Inseminação Artificial .....	6
1.3 Selecção de éguas adequadas para IA .....	9
1.4 Momento e Frequência da Inseminação.....	12
1.5 Técnica de Inseminação Artificial .....	15
2 O ÚTERO.....	19
2.1 Breve revisão anatómica .....	19
2.2 Métodos de avaliação das características uterinas.....	22
2.2.1 Palpação Rectal .....	22
2.2.2 Ecografia Uterina.....	24
2.2.3 Cultura Uterina .....	32
2.2.4 Citologia Uterina .....	35
2.2.5 Biópsia Uterina .....	42
3 MECANISMOS DE DEFESA UTERINA .....	47
3.1 Barreiras Físicas .....	48
3.2 Limpeza Mecânica .....	49
3.3 Mecanismos Humorais.....	51
3.4 Mecanismos Celulares e Mediadores pró e anti-inflamatórios .....	52
4 RESPOSTA INFLAMATÓRIA PÓS-COBERTURA OU PÓS-INSEMINAÇÃO .....	56
4.1 Papel dos espermatozóides .....	57
4.2 Papel da concentração, volume e tipo de sémen .....	60
4.3 Papel do plasma seminal .....	62
4.4 Papel dos diluidores .....	68
4.5 Papel do local de deposição do sémen e momento da IA .....	71
IV – RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA APÓS INSEMINAÇÃO: ESTUDO RETROSPECTIVO DE 27 ÉGUAS .....	72
1. Objectivo .....	72
2. Material e Métodos.....	72
3. Resultados .....	77
4. Discussão .....	84
5. Conclusão .....	90
BIBLIOGRAFIA.....	92

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Centro de Recolha e Congelação de Sêmen Equino, número PT3E01CS, propriedade da Lusopecus Lda	1
Figura 2 – Imagens ecográficas de diagnósticos de gestação precoce de éguas com 11 dias, 16 dias, 21 dias, 23 dias, 36 dias e 45 dias de gestação	2
Figura 3 – Pônei atacada por canídeos: antes e após cirurgia reconstrutiva	3
Figura 4 – Inseminação artificial com sêmen fresco pela técnica transvaginal	17
Figura 5 – Representação esquemática do útero de uma égua	19
Figura 6 – Representação esquemática de uma secção transversal da parede uterina evidenciando as camadas que a constituem	21
Figura 7 – Representação esquemática do útero de uma égua em diestro, demonstrando a posição da sonda ecográfica em relação ao corno e o corpo uterino e a respectiva imagem ecográfica	26
Figura 8 – Edema uterino grau 0	28
Figura 9 – Edema uterino grau 1	29
Figura 10 – Edema uterino grau 2	29
Figura 11 – Edema uterino grau 3	29
Figura 12 – Edema uterino grau 4	30
Figura 13 – Edema uterino grau 5 (hiperedema)	30
Figura 14 – Ecografia de acumulação de fluido intra-uterino	31
Figura 15 – Ecografia de égua com urómetra (a), piómetra (b) e pneumoútero (c)	32
Figura 16 – Imagem microscópica de polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) obtidos numa citologia endometrial de égua com endometrite activa	40
Figura 17 – Representação esquemática dos mecanismos de defesa uterina em éguas	55
Figura 18 – Representação esquemática de espermatozóide de garanhão	56
Figura 19 – Gráfico ilustrativo da distribuição dos estados reprodutivos das éguas na amostra	71
Figura 20 – Gráfico representativo da distribuição das inseminações realizadas com os vários tipos de sêmen	73
Figura 21 – Exemplo de líquidos de lavagem terapêutica obtidos de 3 éguas com diferentes reacções inflamatórias uterinas 24 horas após IA	74
Figura 22 – Exemplo de uma citologia endometrial de uma égua com inflamação	



uterina (A=400x) onde é possível observar um grande número de neutrófilos dispersos por todo o campo microscópico	75
Figura 23 – Gráfico ilustrativo da relação entre a idade e a presença de inflamação uterina	77
Figura 24 – Representação gráfica da incidência da inflamação uterina nos grupos de éguas com idade < 15 anos e ≥15 anos	77
Figura 25 – Representação gráfica da relação entre o estado reprodutivo das éguas e o desenvolvimento da resposta inflamatória uterina	78
Figura 26 – Gráfico ilustrativo da relação entre a incidência da inflamação uterina e o tipo de sémen utilizado na IA	79
Figura 27 – Gráfico ilustrativo da incidência da inflamação uterina nos grupos de éguas inseminadas com ejaculados com e sem plasma seminal	79
Figura 28 – Gráfico ilustrativo da incidência da inflamação uterina nos grupos de éguas inseminadas com recurso à inseminação intracornual profunda e no corpo uterino	80
Figura 29 – Representação gráfica da relação obtida entre o edema uterino antes da IA e o desenvolvimento da inflamação uterina pós-inseminatória	81
Figura 30 – Gráfico ilustrativo da relação entre a idade e o grau de edema uterino antes da IA	82
Figura 31 – Representação gráfica da relação entre o DG e a presença ou ausência de uma inflamação uterina após IA	83

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Métodos quantitativos de interpretação de amostras de citologia endometrial de equinos	39
Tabela 2 - Composição e alguns parâmetros do plasma seminal de garanhão	62
Tabela 3 – Número de inseminações efectuadas com e sem plasma seminal e a sua relação com o desenvolvimento da inflamação uterina após IA	80
Tabela 4 – Número de inseminações efectuadas no corpo uterino e intracornuais profundas e a sua relação com o desenvolvimento da inflamação uterina após IA.	81

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN – Ácido desoxirribonucleico  
AST – Aspartato-aminotransferase  
ATP – Adenosina-trifosfato  
CG-LS – Chorionic gonadotrophin-like substance  
CRISP – Cysteine-rich secretory proteins  
COX-2 – Cicloxigenase 2  
DG – Diagnóstico de gestação  
*et al.* – *et alii* (e outros)  
e.g. – *exempli gratia* (por exemplo)  
FA – Fosfatase alcalina  
Fn-2 – Fibronectina tipo 2  
FSH – Hormona foliculo-estimulante  
GGT –  $\gamma$ -glutamyltransferase  
GM-CSF – Factor de estimulação de colónias granulócito-macrófago  
GnRH – Hormona libertadora de gonadotrofinas  
GPC - Glicerilfosforilcolina  
hCG – Gonadotrofina coriónica humana  
HEPES – Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etano-sulfónico  
HSP-1 – Heat shock protein 1  
HSP-2 – Heat shock protein 2  
IA – Inseminação artificial  
Ig - Imunoglobulina  
IL - Interleucina  
kDa – Quilodalton

LDH – Lactato-desidrogenase  
LH – Hormona luteinizante  
LTB<sub>4</sub> – Leucotrieno B<sub>4</sub>  
MHz – Megahertz  
mL - Mililitro  
NETs – Neutrophil extracellular traps  
Ng – Nanograma  
NO – Óxido nítrico  
PGE – Prostaglandina E  
PGF<sub>2</sub> $\alpha$  – Prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$   
PLA<sub>2</sub> – Fosfolipase A<sub>2</sub>  
PMNs – Polimorfonucleares neutrófilos  
RAO – Recurrent airway obstruction  
RNAm – ácido ribonucleico mensageiro  
RNIs – Intermediários reactivos do azoto  
ROIs – Intermediários reactivos do oxigénio  
SP1 – Proteína do plasma seminal 1  
SP2 – Proteína do plasma seminal 2  
Spz – Espermatozóide  
TGF $\beta$  – Factor de transformação do crescimento  $\beta$   
TNF $\alpha$  – Factor de necrose tumoral  $\alpha$   
TRH – Hormona libertadora de tirotropina  
TSA – Teste de sensibilidade a antibióticos  
UE – União Europeia  
UI – Unidades Internacionais



## I – ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO

Esta dissertação tem por base as actividades práticas desenvolvidas durante o Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Este estágio decorreu durante 5 meses, entre Janeiro e Maio de 2011, na Lusopecus Lda, empresa de prestação de serviços veterinários sediada no Porto Alto, sob orientação de um dos seus proprietários, o Dr. José Carlos Duarte, acompanhando preferencialmente o trabalho desenvolvido pela Dra. Cristina Cosinha.

O principal objectivo deste estágio consistiu na aquisição e aprofundamento de conhecimentos teóricos e sobretudo práticos, sobre reprodução equina. Para tal, contribuiu não só a participação nas actividades clínicas diárias do Centro de Recolha e Congelação de Sêmen Equino, número PT3E01CS (registo na UE), propriedade da Lusopecus Lda. (Figura 1), como o acompanhamento da actividade de clínica veterinária ambulatória.

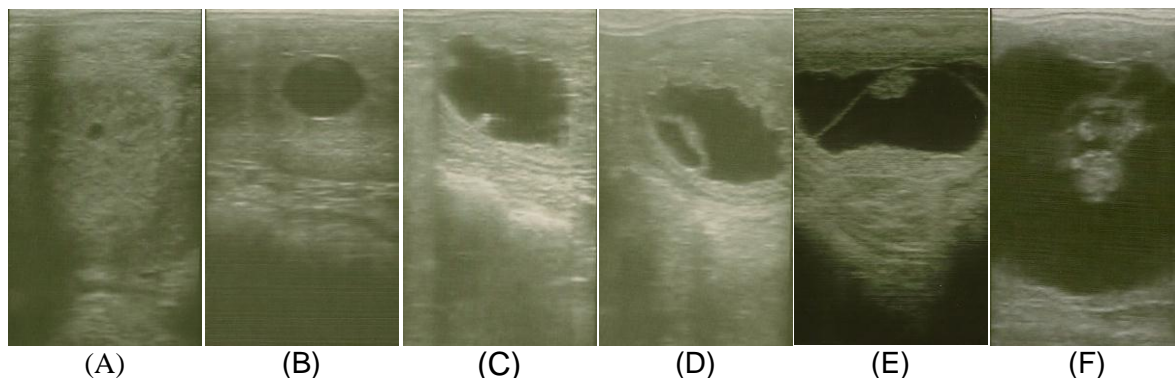
Figura 1 - Centro de Recolha e Congelação de Sêmen Equino, número PT3E01CS, propriedade da Lusopecus Lda (original).



Foram muitas as actividades desenvolvidas durante estes meses de trabalho mas a grande maioria dos casos observados foi, naturalmente, na vertente de Reprodução Equina.

Como a época reprodutiva este ano se iniciou mais tardiamente, os primeiros dois meses de estágio incidiram sobretudo sobre a recolha e processamento do sêmen para criopreservação, incluindo toda a casuística associada à sanidade deste sêmen para exportação. Estas actividades desenvolveram-se ainda durante os restantes meses de estágio. Nos meses subsequentes, a maioria das actividades desenvolvidas abrangeram o manejo e controlo reprodutivo de éguas, com aplicação de técnicas de sincronização e indução de estro, monitorização do ciclo éstrico por palpação e ecografia transrectal e diagnósticos de gestação precoces (Figura 2) e tardios; aplicação de técnicas de reprodução assistida, nomeadamente a inseminação artificial e diagnóstico e tratamento de patologias reprodutivas, como por exemplo as endometrites pós-coitais. Foi também efectuado com frequência o manejo e processamento de sêmen fresco e refrigerado.

Figura 2 – Imagens ecográficas de diagnósticos de gestação precoce de éguas com 11 dias (A), 16 dias (B), 21 dias (C), 23 dias (D), 36 dias (E) e 45 dias (F) de gestação.



As actividades com maior prevalência durante todo o estágio foram a manipulação hormonal e o diagnóstico folicular e de gestação. O diagnóstico folicular foi efectuado dentro do programa de monitorização das éguas a inseminar com o intuito de previsão do momento de ovulação. Neste foi avaliado o tamanho, forma e localização dos folículos ovários por palpação e ecografia tranrectal, a consistência da parede folicular por palpação e avaliada a presença de partículas ecogénicas no fluido folicular. Foi igualmente efectuado um diagnóstico ecográfico das características uterinas, nomeadamente no que respeita ao edema das pregas endometriais e à presença de líquido intrauterino. O diagnóstico de gestação foi efectuado recorrendo-se também à palpação e ecografia transrectal, na sua maioria 15 dias após cobrição ou inseminação artificial.

Não obstante, foram também realizadas outras actividades veterinárias na área da profilaxia (desparasitação e vacinação de pequenos efectivos), identificação equina (resenho, recolha de amostras de sangue e colocação de microchip) e diagnóstico e tratamento de patologias dos vários sistemas orgânicos:

- músculo-esquelético – exames em acto de compra, avaliação de claudicações de localização variada, exames complementares de diagnóstico (radiografias, ecografias a ligamentos e tendões, bloqueios anestésicos perineurais e intra-articulares), infiltrações articulares e de ligamentos e tratamentos variados (e.g. laminite, tendinite);
- respiratório – foram seguidos dois casos, ambos de obstrução recorrente das vias aéreas inferiores (RAO);
- digestivo – correcções dentárias, extracção de dentes de lobo, um caso de cólica por impactação e um caso de hérnia inguinal;
- ocular – um caso de úlcera da córnea por lesão com pragana;
- pele – feridas, dermatofitoses, parasitoses externas.

Foi também possível acompanhar algumas cirurgias, incluindo três orquiectomias, todas elas com os garanhões em estação, sob sedação e anestesia local. Foi acompanhada também uma correção cirúrgica, em ambulatório, de uma laceração da parede abdominal com exposição visceral, realizada com o animal em decúbito lateral, com sedação e anestesia geral e uma reconstituição cirúrgica da vulva, ânus e nádega de um pônei atacado por cães, com o animal em estação e sob sedação (Figura 3).

Figura 3 – Pônei atacada por canídeos: antes (A) e após (B e C) cirurgia reconstrutiva



Foi ainda possível participar nas diversas actividades diárias desenvolvidas, colaborando activamente na administração de fármacos pelas diversas vias (oral, endovenosa e intramuscular), no tratamento de feridas e mudança de pensos, na recolha de sangue e de zaragatoas de prepúcio, fossa uretral e líquido pré-ejaculatório para rastreio de doenças venéreas, nas recolhas de sémen com vagina artificial, no diagnóstico reprodutivo por palpação e ecografia transrectal, entre outros. Durante este período foi possível também discutir a etiologia, diagnósticos diferenciais, a terapêutica e os prognósticos dos diversos casos encontrados com o Dr. José Carlos, com a Dra. Cristina e com uma Colega também ela Estagiária.

## **II – OBJECTIVO DO TRABALHO**

O tema deste trabalho surgiu não só devido ao gosto pessoal pela vertente da reprodução equina, mas também resultou das múltiplas inseminações acompanhadas durante os 5 meses deste estágio com constatação da crescente importância da resposta inflamatória uterina desenvolvida após inseminação no aumento do número de inseminações por égua e na redução da taxa de concepção. Tal facto revela-se particularmente importante na actual conjuntura económica nacional onde todo o trabalho, tempo e meios têm que ser rentabilizados ao máximo.

Assim sendo, este trabalho teve como objectivo estudar a influência de parâmetros como a idade e estado reprodutivo da égua, o tipo de sémen, a presença de plasma seminal, o momento e a técnica de inseminação artificial, e as características do útero antes da inseminação no estabelecimento da resposta inflamatória uterina após inseminação e a sua repercussão na taxa de concepção.

### III – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 1 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

##### 1.1 Revisão Histórica

A inseminação artificial (IA), por definição, consiste na colheita de sémen de um macho, normalmente com mérito genético superior, seguida da sua transferência para uma fêmea sexualmente receptiva, na altura da ovulação, de modo a que resulte em fertilização (Morel, 1999).

É uma técnica utilizada em muitos Mamíferos, incluindo a espécie humana, espécies de interesse pecuário e animais exóticos em cativeiro.

A primeira referência da utilização da IA em equinos remonta a 1322, pelos Árabes, no entanto foi só em 1780 que esta técnica foi documentada pela primeira vez. Este relato foi feito pelo fisiologista italiano Spallanzani que, depois de ter obtido sucesso com Anfíbios, tentou a inseminação de uma cadela com sémen fresco directamente no útero. A experiência foi um sucesso e resultou no nascimento de três crias. Mais tarde avaliou a sua técnica em equinos. Durante a sua pesquisa Spallanzani conseguiu, estabelecer que os componentes férteis do sémen são os espermatozóides em vez do fluido a eles associado (plasma seminal), que foi por ele removido por filtração (Morel, 1999).

Foi em 1803 que Spallanzani conduziu as suas primeiras experiências na refrigeração do sémen. Na mesma altura, congelou sémen usando neve. Verificou então que os espermatozóides ficavam imóveis quando em contacto com a neve mas que não morriam, recuperando a sua motilidade depois de aquecidos, se bem que esta motilidade estivesse diminuída (Morel, 1999; Bearden & Fuquay, 1998).

Os programas de IA aplicados a espécies pecuárias numa conjuntura mais comercial começaram a ser desenvolvidos na Rússia e na China nos finais do século XIX existindo relatos da sua utilização em vários países europeus nos últimos anos deste século.

Não obstante, apenas a partir de 1900 foram iniciados estudos extensos nesta área, por parte da Rússia, imediatamente seguida pelo Japão (Ax *et al.*, 2004).

A invenção da vagina artificial representou um grande marco no desenvolvimento e sucesso da IA. Em 1914, G. Amantea, professor de Fisiologia Humana na Universidade de Roma, desenvolveu o primórdio da actual vagina artificial, através do seu trabalho desenvolvido com canídeos. Apenas em 1930 foi feito um paralelismo para as espécies pecuárias sendo desenvolvida, nesse mesmo ano, a primeira vagina artificial para garanhões. Tal feito é atribuído a trabalhadores do Laboratório Ivanoff, em Moscovo. Este laboratório continuou na vanguarda da colheita de sémen e inseminação criando novas técnicas, das quais se destaca o primeiro relato de utilização de um manequim de égua, em 1935 (Morel, 1999).



Em 1930, as técnicas a utilizar na IA em equinos estavam devidamente estabelecidas e a sua utilização difundiu-se por todo o mundo.

Em 1962, a estimativa mundial do número de IA em animais era de 750000, das quais 80% foram realizadas na China.

O nascimento do primeiro poldro resultante de IA com sêmen congelado, colhido através de vagina artificial, ocorreu apenas em 1968, nos EUA. Nos 6 anos subsequentes nasceram 600 poldros concebidos com este método.

A IA na espécie equina tornou-se também muito mais exequível com o aparecimento dos programas de sincronização e indução de estro (Ax *et al.*, 2004).

Actualmente a IA é uma técnica amplamente utilizada na reprodução equina em Portugal.

## **1.2 Vantagens da Inseminação Artificial**

O aumento do interesse na IA em equinos que se verificou nos últimos 25 anos é um reflexo directo do aumento no número de cavalos, do desenvolvimento de um novo interesse associado à equitação de lazer e da percepção das vantagens económicas deste procedimento.

São várias as vantagens da utilização da IA na reprodução de equinos, salientando-se o melhoramento genético proporcionado pela crescente utilização de machos com um mérito genético superior e a introdução de novos genes graças à importação de sêmen de outros países (Morel, 1999; Costa, 2008). Efectivamente, uma das maiores vantagens económicas da IA é esta ser responsável pela disseminação da genética de garanhões seleccionados por todo o mundo e pela disseminação de um vasto conjunto de características genéticas em diferentes populações aumentando, deste modo, a variabilidade genética local. A IA permite que animais geograficamente separados sejam acasalados sem que haja necessidade do seu transporte. Para tal contribui o facto de o sêmen, congelado e refrigerado, poder ser expedido com facilidade a nível mundial ultrapassando-se, assim, as barreiras geográficas (Morel, 1999). Como o sêmen ou é recolhido imediatamente antes da IA ou se encontra refrigerado/ congelado e devidamente identificado, há uma maior facilidade na determinação da paternidade numa série de condições ambientais e de maneo, melhorando a selecção (Ax *et al.*, 2004).

A IA possui também importante papel na preservação do germoplasma do garanhão em caso de doença ou morte. A capacidade de congelar sêmen possibilita o seu armazenamento para a posterioridade, podendo ser utilizado para IA no futuro distante ou no desenvolvimento de um banco genético. Neste é armazenado sêmen de garanhões com grande qualidade genética, havendo assim a possibilidade de reintrodução destes genes numa população muito depois da sua morte. O mesmo se aplica a garanhões de raças em

vias de extinção (Morel, 1999; Costa, 2008).

O facto de o sémen num programa de IA ser recolhido, por norma, com vagina artificial possibilita a divisão do ejaculado em várias doses para inseminação permitindo um aumento da eficiência de utilização do garanhão e um aumento significativo do número de éguas que um garanhão pode cobrir durante a época reprodutiva. Acrescenta-se também a diminuição do risco de uso físico excessivo de garanhões mais populares e a promoção de um acesso mais generalizado a estes animais (Blanchard, *et al.*, 2003; Morel, 1999; Costa, 2008).

A IA permite também que os garanhões possam ser simultaneamente cavalos de competição e reprodutores, beneficiando não só do facto de os programas de IA não exigirem grandes temporadas em extensivo em contacto com as éguas, onde é negligenciado o programa de exercício físico, como do aumento da segurança de utilização do garanhão (Blanchard, *et al.*, 2003; Morel, 1999; Costa, 2008). A redução ao máximo do contacto directo entre o garanhão e a égua diminui em larga escala o risco de lesões de contacto, sendo não só vantajoso para o garanhão como também para as éguas, geralmente fisicamente inferiores ao garanhão. Acrescenta-se o facto de, nos programas de IA, o sémen ser colhido geralmente em dias alternados sendo estas recolhas feitas, idealmente, com recurso a um manequim, podendo não haver necessidade de utilizar uma égua em cio (Blanchard, *et al.*, 2003; Morel, 1999). Este tipo de concepção aumenta também a segurança dos funcionários envolvidos.

A IA permite também que sejam utilizados garanhões lesionados, especialmente com lesões ao nível dos membros posteriores, pélvis e coluna vertebral, que não são capazes de proceder à monta natural. Assim sendo, a IA pode prolongar a carreira reprodutiva destes garanhões. Deve ser tomado um cuidado especial na identificação dessas lesões e determinar se possuem ou não um carácter hereditário (Morel, 1999).

É igualmente útil o facto de a IA possibilitar uma monitorização e avaliação regular da qualidade seminal, permitindo que sejam detectados precocemente problemas que podem afectar negativamente a fertilidade dos garanhões e que, consequentemente, sejam tomadas medidas correctivas de imediato (Blanchard, *et al.*, 2003; Morel, 1999; Costa, 2008).

O processamento do sémen que antecede a IA também se revela bastante vantajoso. A sua concentração (centrifugação), filtração e a adição de diluidores de sémen protectores possibilita a produção de uma amostra de boa qualidade através de ejaculados de menor qualidade, favorecendo um aumento do potencial reprodutivo de garanhões sub-férteis ou com sémen de menor qualidade. Aumenta também as hipóteses de fertilização de éguas inseminadas com este tipo de ejaculado (Blanchard, *et al.*, 2003; Morel, 1999).

A IA possibilita a utilização de éguas problemáticas excluídas da monta natural por possuírem, por exemplo, problemas ortopédicos, como laminite e/ou doença do navicular, ou

um temperamento agressivo/ nervoso. À semelhança do referido para os garanhões lesionados, devem ser tomados cuidados particulares na identificação destes problemas de modo a garantir que estes não possuem carácter hereditário e, como tal, não são transmitidos à descendência (Morel, 1999).

A IA permite também a utilização de éguas com uma elevada resposta inflamatória pós-coito (endometrite pós-coito). Todas as éguas apresentam um certo grau de endometrite pós-coito devido à resposta imunológica natural ao ejaculado. No entanto, algumas éguas respondem de forma mais exuberante. Esta reacção inflamatória severa pode comprometer a capacidade do útero para manter uma gravidez. Estas éguas beneficiam não só de inseminações com doses mais pequenas quando comparado com um ejaculado de monta natural, como de IAs com sémen diluído em diluidor apropriado e da utilização de técnicas de IA de contaminação mínima para o útero (Morel, 1999; Costa, 2008). A indução do estro e uma monitorização intensiva permite que seja realizada uma única inseminação no momento exacto, em alternativa às várias montas naturais tradicionalmente praticadas por cada ciclo ovulatório (Morel, 1999, 2003).

A IA revela-se extremamente útil no controlo de doenças venéreas. Todo o garanhão deve ser considerado como uma potencial fonte de doenças venéreas para a égua, como tal, a testagem do sémen antes da inseminação, associada à adição de antibióticos nos diluidores de sémen, diminui a hipótese de transmissão de doenças venéreas quando comparado com a monta natural (Blanchard, *et al.*, 2003; Morel, 1999). Deve ser efectuado o rastreio não só de doenças venéreas bacterianas (Metrite Contagiosa Equina), como de doenças venéreas virais (Arterite Viral Equina, Exantema Coital Equino e ainda Anemia Infecciosa Equina).

A IA representa ainda um incentivo a um exame de rotina do tracto reprodutivo da égua pois a monitorização intensiva realizada antes da inseminação permite o diagnóstico precoce de problemas que, de outra forma, passariam despercebidos instituindo-se, então, um tratamento mais rápido e mais adequado (Morel, 1999).

Quando realizada adequadamente, existem poucas desvantagens na sua utilização, sendo no entanto necessário dispor de pessoal treinado e qualificado na colheita e processamento do sémen e na inseminação das éguas. Tal justifica-se devido à enorme sensibilidade dos espermatozóides às variações ambientais (Blanchard, *et al.*, 2003; Morel, 1999). Uma colheita, manuseamento e processamento de sémen e uma técnica de inseminação incorrectas podem diminuir dramaticamente as taxas de concepção (Blanchard, *et al.*, 2003). É essencial que sejam garantidas as condições adequadas para o maneo das fêmeas durante a terapêutica hormonal, na detecção de cios e na própria inseminação, particularmente em condições de criação em regime extensivo (Ax *et al.*, 2004). O investimento necessário para aquisição do equipamento necessário para a IA é elevado e, como tal, constitui uma das desvantagens à utilização desta técnica reprodutiva. Há também

aumento do risco de lesão do pessoal técnico associado à recolha do sémen quando feita através de vagina artificial (Blanchard *et al.*, 2003).

### **1.3 Selecção de éguas adequadas para IA**

A escolha tanto do garanhão como da égua para um programa reprodutivo pode ser um processo muito complicado e demorado. Infelizmente, é muito frequente dispensar-se demasiado tempo na selecção das características de conformação e *performance* atlética negligenciando-se um pouco o valor da competência uterina da égua, o que pode resultar num aumento significativo de insucessos e dos custos associados à cobertura.

Em teoria, todas as éguas consideradas para cobertura natural podem ser utilizadas num programa de IA. A IA pode ser utilizada em todas as categorias de éguas, alfeiras, primíparas, múltiparas e paridas. Efectivamente, a IA é muitas vezes o último recurso, sendo utilizada em éguas que por qualquer motivo se encontram impossibilitadas de ser cobertas por monta natural (e.g. alterações esqueléticas, comportamentais, anomalias do períneo) (Morel, 1999).

Assim sendo, devem ser tidos em conta diversos critérios de competência reprodutiva quando se selecciona uma égua para um programa reprodutivo, particularmente se se pretender recorrer à inseminação artificial. Deve dar-se especial importância à história pregressa reprodutiva e geral, à idade, ao temperamento, à conformação geral, à condição corporal e à conformação externa e interna do tracto reprodutivo (Morel, 2003).

Os detalhes relevantes da história reprodutiva para uma escolha correcta de uma égua incluem a regularidade dos ciclos éstricos, a duração normal do ciclo éstrico e, em particular, da fase de estro, e momento em que a égua inicia a época reprodutiva.

É também relevante que seja conhecido o seu comportamento de estro, sinais particulares e circunstâncias em que melhor exhibe este comportamento. A aquisição de informação sobre o comportamento de estro é particularmente útil quando se pretende cobrir éguas comaios discretos e que facilmente podem deixar de ser identificados se não for feita uma monitorização reprodutiva apertada. A perda de um cio significa, necessariamente, o aumento da frustração e descontentamento do proprietário e os custos associados à cobertura destas éguas.

É também extremamente útil tomar conhecimento de éguas que no passado já tenham demonstrado comportamentos mais agressivos para com os garanhões, principalmente quando se pretende a sua utilização num programa de cobertura natural. Nestes casos a utilização deste tipo de éguas está completamente desaconselhado sendo preferível que se recorra à sua inseminação para preservar a integridade do garanhão.

Outros dados importantes são o número de gestações, a história de abortos, reabsorções

embrionárias, distócias ou de gestações gemelares, a demonstração de comportamentos anormais direccionados ao poldro (rejeição ou ataques), a incidência de infecções no tracto genital e terapêuticas instituídas. Quando existe uma história de reabsorções embrionárias repetidas, tal pode ser indicativo de que a égua apresenta algum defeito de índole hormonal ou que não é capaz de levar uma gestação a termo por incompetência uterina e/ou uma anomalia genética. Idealmente, estas éguas devem ser excluídas do programa reprodutivo mas, caso se verifique que a reabsorção embrionária resulta de uma carência hormonal, nomeadamente em progesterona, que as éguas apresentem um grande potencial genético tendo os proprietários um grande interesse na sua reprodução, as éguas podem ser cobertas sendo imediatamente suplementadas hormonalmente. A incidência de gestações gemelares repetidas pode ser um problema pois existe uma enorme probabilidade de a égua abortar um ou mesmo os dois fetos. Quando a gestação é levada a termo é comum que sejam nados-mortos ou que um ou ambos os neonatos morram. Mesmo que um dos fetos sobreviva este vai ser sempre mais pequeno e fraco que o normal, o que não é de todo pretendido pelo criador. Assim sendo, as éguas devem ser sempre inspeccionadas com muito cuidado no diagnóstico de gestação precoce para detecção da eventual presença de duas vesículas embrionárias. Se for este o caso, deve-se proceder de imediato à eliminação de uma das vesículas ou à indução do aborto (Morel, 2003,1999).

A informação sobre a história clínica geral das éguas também se revela útil na selecção das reprodutoras, podendo incluir dados sobre o estado vacinal, desparasitações, traumatismos (especialmente se envolverem a zona pélvica, os músculos abdominais, se puderem causar lesões internas ou se afectarem os membros posteriores), patologias de foro ortopédico, nomeadamente laminites, doença do navicular e tendinites, e patologias do foro respiratório ou cardíaco. Também é relevante a aquisição de informações sobre a presença de hérnias umbilicais e prolapso vaginal. Todas estas condições podem ser exacerbadas pela gestação e algumas delas podem ainda ter um carácter hereditário, não sendo de todo aconselhável a sua perpetuação para gerações futuras (Morel, 2003).

O tipo de temperamento da égua é especialmente importante não só na fase de cobrição como também no nascimento e no convívio com poldros jovens. O temperamento é uma característica hereditária, como tal, o temperamento de ambos os progenitores terá uma grande influência no carácter do poldro, salientando-se principalmente o temperamento da égua devido à sua proximidade com o poldro até ao desmame. Éguas mais nervosas e agressivas necessitam de ser mais contidas e manipuladas, o que aumenta significativamente o nível de *stress* a que estão sujeitas, aumentando, consequentemente, o número de abortos e reabsorções embrionárias fruto desse tipo de maneio (Morel, 2003).

As éguas devem ser seleccionadas para primeira cobrição entre os 5 e os 12 anos de idade. Antes dos 5 anos as éguas não se encontram completamente desenvolvidas apresentando

ainda grandes necessidades nutricionais associadas ao crescimento. Cobrir estas éguas significa acrescentar a estas necessidades as necessidades associadas a uma gestação, logo, manter uma gestação nestas condições pode representar um grande desafio. Éguas nulíparas com idade superior a 12 anos também apresentam maiores dificuldades em manter uma gestação devido ao aumento da incidência de defeitos embrionários, à redução da viabilidade dos óvulos e a um aumento da incidência da endometrite devido à idade. Por terem permanecido a maioria da sua vida sem contacto com um garanhão, tendem a rejeitá-lo e a reagir-lhe com maior agressividade. Estas éguas podem também ter problemas associados à sua utilização prévia. Por exemplo, muitas éguas de desporto, devido à sua condição atlética, apresentam uma enorme variedade de disfunções na actividade reprodutiva, tais como diestros prolongados e estros curtos, necessitando de um período de adaptação antes de se encontrarem física e fisiologicamente aptas a reproduzir. Muitas vezes, durante a actividade desportiva, são submetidas a tratamentos com corticosteróides ou esteróides anabolizantes, o que também pode provocar um distúrbio na sua função reprodutiva até que estes fármacos sejam totalmente eliminados. No caso de uma égua que foi sempre utilizada para reprodução, a idade tem menor relevância, sendo apenas aconselhável que não sejam utilizadas para reprodução éguas com idade superior a 20 anos, embora a “idade da reforma” de uma égua dependa muito da raça, tipo e situação clínica de cada animal (Morel, 1999).

A égua necessita de ter uma conformação e condição corporal geral adequada para ser utilizada na reprodução. Necessita de ter membros posteriores e dorso fortes para que consiga sustentar o peso extra do feto e anexos fetais, principalmente durante o último terço da gestação, uma conformação pélvica correcta com a abertura pélvica que permita um parto seguro e diminua o risco de distócia e uma condição corporal adequada, idealmente 3 na escala de 5. Éguas magras podem apresentar anestros prolongados ou ciclos éstricos de duração anormal (muito longos ou curtos), bem como não apresentarem qualquer actividade reprodutiva em casos de emaciação severa. Por outro lado, éguas obesas apresentam falhas reprodutivas devido ao excesso de deposição de gordura no tracto reprodutivo (Morel, 2003).

Deve também avaliar-se a competência do tracto reprodutivo, tanto externa como internamente. Na avaliação externa deve-se ter especial atenção à conformação perineal e vulvar. Éguas com conformação perineal e vulvar anormal (Índice de Caslick superior a 50) apresentam invariavelmente outros problemas com repercussão interna prejudiciais para a sua capacidade de concepção. Éguas cujos lábios vulvares não se encontram devidamente coaptados são mais susceptíveis à entrada de agentes patogénicos na vagina e à contaminação posterior do tracto genital cranial. Apresentam também uma maior predisposição para desenvolverem urovagina, pneumovagina e infecções uterinas. A

selecção de uma égua que foi anteriormente submetida a uma vulvoplastia deve ser muito cuidadosa pois existe um número limitado de vezes em que se pode recorrer a esta cirurgia, o que reduz consideravelmente a duração da sua carreira reprodutiva. Existem cada vez mais evidências de que a conformação perineal é um carácter hereditário, logo, não é de todo aconselhável a reprodução de éguas com conformação perineal anormal (Morel, 1999; Morel, 2003).

Na avaliação interna deve-se fazer uma análise completa e pormenorizada das características da vagina, cérvix, útero e ovários. Esta avaliação é geralmente realizada através de palpação rectal e ecografia transrectal, podendo também recorrer-se à observação directa da vagina e cérvix com espéculo vaginal, à realização de uma cultura e citologia uterina, biópsia uterina ou mesmo à realização de um exame endoscópico. Deve ser pesquisada a presença de feridas, irritações, infecções, cicatrizes, lacerações, pólipos, neoplasias, conteúdo vaginal anormal, como seja a presença de urina, corpos estranhos, sangue ou pús, a presença de quistos uterinos e ováricos, conteúdo intra-uterino (fluido ou ar), distensão dos ligamentos largos, saculações e adesões, devendo ser também avaliada a involução uterina e a forma e competência do cérvix. Todas estas condições podem reduzir significativamente a capacidade reprodutiva de uma égua, podendo ser um factor de exclusão de um programa de IA (Morel, 1999, 2003).

#### **1.4 Momento e Frequência da Inseminação**

Após selecção e confirmação da competência reprodutiva da égua a inseminar, todo o trabalho deve ser desenvolvido de modo a que as taxas de concepção sejam maximizadas. A inseminação pode ser realizada em éguas ciclicamente normais que tenham sido identificadas em estro. O estro pode ser identificado por observação do seu comportamento, por estimulação com garanhão, com rufião (cavalo castrado que é utilizado meramente para detecção das éguas que estão em estro), com uma égua androgenizada ou com recurso à ecografia e palpação transrectal (England, 2005; Morel, 1999; Costa, 2008). Contudo, o período de estro é relativamente longo e muito variável de égua para égua e existe também uma enorme variabilidade na longevidade dos espermatozóides e do oócito no tracto reprodutivo da fêmea. O tempo de viabilidade dos espermatozóides é muito superior ao do oócito, cuja viabilidade máxima se mantém, normalmente, durante apenas 1 a 6 horas após a ovulação (England, 2005; Morel, 1999). Assim sendo, é essencial que o momento da inseminação esteja sincronizado o mais possível com a ovulação de modo a maximizar a taxa de fertilização e, conseqüentemente, o sucesso de um programa de inseminação artificial (Morel, 1999). Seguindo esta máxima, o momento óptimo para a cobrição ou inseminação artificial é entre as 24 e as 48 horas antes da ovulação, permitindo, assim, que

haja tempo suficiente para que ocorra a capacitação dos espermatozóides (England, 2005). A sincronização entre a inseminação e a ovulação pode revelar-se um procedimento relativamente difícil, sendo por vezes necessário efectuar várias inseminações durante um período de estro.

Em muitos programas de inseminação artificial, à semelhança do que é realizado num programa reprodutivo de cobrição natural, são obtidos bons resultados quando são efectuadas inseminações a cada 48 horas. Este procedimento inicia-se no segundo ou terceiro dia do estro e mantém-se enquanto a égua continuar a exibir comportamento de estro e a aceitar o garanhão, ou até que seja detectada ecograficamente uma ovulação (Morel, 1999; Blanchard *et al.*, 2003).

No entanto, devido ao longo e inconstante período de estro das éguas, este procedimento pode envolver um elevado número de inseminações, aumentando consideravelmente os custos associados a este tipo de cobrição (Morel, 1999). Portanto, é recomendável que as éguas sejam convenientemente monitorizadas antes de se proceder à sua inseminação. Para tal, assim que surjam os primeiros sinais de estro ou no momento em que se prevê que este tenha início, deve ser realizada uma avaliação minuciosa do tracto genital por palpação rectal e ecografia transrectal de modo a que se possa prever o mais correctamente possível o momento da ovulação. Este procedimento permite minimizar o número de inseminações necessárias por ciclo éstrico e, conseqüentemente, aumentar a eficiência global de um programa reprodutivo bem como reduzir muito o risco de contaminação iatrogénica do tracto reprodutivo da égua, factor que se revela fulcral particularmente em éguas com maior susceptibilidade para o desenvolvimento de infecções uterinas (Morel, 1999; Blanchard *et al.*, 2003). A realização de inseminações diárias ou bi-diárias raramente resulta numa melhoria das taxas de concepção, estando portanto em franco desuso. A sua utilização está limitada a casos pontuais de garanhões cujo sémen apresenta espermatozóides de fraca viabilidade (Blanchard *et al.*, 2003).

Na maioria dos casos, numa inseminação com sémen fresco ou refrigerado, o objectivo é inseminar a égua uma única vez imediatamente após a identificação de um folículo de Graaf de diâmetro igual ou superior a 35 mm, ou seja, inseminar a égua até 48 horas antes da ovulação. As éguas devem ser monitorizadas para confirmar a ocorrência da ovulação e se se verificar que a égua não ovula até 48 horas após a inseminação, esta deve ser novamente inseminada (Blanchard *et al.*, 2003; Morel, 1999).

Ao utilizar sémen de qualidade, são obtidas taxas de concepção aceitáveis quando a inseminação é realizada até 72 horas antes da ovulação (Blanchard *et al.*, 2003). Por outro lado é observada uma redução drástica das taxas de concepção em cobrições realizadas com um intervalo superior a 4 dias antes da ovulação (England, 2005). Quando se trabalha com um garanhão de fertilidade desconhecida ou quando se utiliza sémen refrigerado é



recomendável que a inseminação seja ligeiramente prorrogada, devendo ser realizada até 24 horas antes da ovulação (Morel, 1999).

A inseminação artificial com sémen congelado, devido à menor longevidade dos espermatozóides, deve ser realizada o mais próximo possível do momento da ovulação. Embora não haja consenso sobre o momento ideal para realizar a inseminação artificial com sémen congelado, a maioria dos investigadores sugere que esta deve ser feita entre as 6 horas antes e as 6 horas após a ovulação, devendo ser repetida se a égua não ovular em 24 horas. Para tal a égua deve ser intensamente monitorizada, sendo a égua avaliada no mínimo 4 vezes por dia, por ecografia transrectal, a fim de prever com maior precisão ou constatar o momento exacto da ovulação (Morel, 1999; Ax *et al.*, 2004).

Há uma grande controvérsia sobre se as éguas devem ser inseminadas antes ou após a ovulação. Num estudo em 1990, Woods e os seus colaboradores revelaram que as melhores taxas de concepção (88%) eram obtidas com uma inseminação única 24 horas antes da ovulação, que a inseminação até 6 horas após ovulação apresentam resultados comparáveis aos da inseminação pré-ovulatória e que esta era mais bem sucedida que a inseminação artificial efectuada 18 a 24 horas após a ovulação (Morel, 1999). Este estudo revela também que em éguas inseminadas desde o momento da ovulação até às 6 horas após ovulação não se verifica um aumento da mortalidade embrionária e que éguas inseminadas 6 a 12 horas após ovulação apresentam taxas de concepção normais associadas a uma maior taxa de mortalidade embrionária. Sustenta ainda que éguas inseminadas 12 a 24 horas após ovulação sofrem, simultaneamente, maiores perdas na taxa de concepção e aumento na taxa de mortalidade embrionária que os dois grupos anteriormente referidos e que éguas inseminadas no período pré-ovulatório (Blanchard *et al.*, 2003). Estes investigadores concluíram também que inseminações realizadas com mais de 30 horas após a ovulação não resultam numa gestação (Morel, 1999).

A área que pode potencialmente beneficiar da inseminação artificial pós-ovulatória é a inseminação com sémen congelado pois os espermatozóides congelados requerem menos tempo para que ocorra a sua capacitação, sendo portanto capazes de fertilizar o oócito mais cedo que os espermatozóides presentes no sémen fresco ou refrigerado (Morel, 1999).

É facilmente perceptível que a capacidade de prever a ovulação é essencial e apresenta muitas vantagens para o Médico Veterinário de equinos. Destaca-se a redução do número de cobrições/ inseminações necessárias, particularmente quando se utilizam garanhões muito requisitados, o aumento da precisão da sincronização do momento da inseminação artificial e da ovulação quando se utiliza sémen congelado ou sémen fresco e refrigerado com fraca viabilidade, a redução do número de inseminações/ cobrições de éguas problemáticas ou de difícil manejo, e a optimização da utilização de bons garanhões com fraca fertilidade.

Actualmente, a sincronização entre a ovulação e a inseminação pode ser melhorada com o recurso à manipulação hormonal. Para este efeito são, podem ser administradas duas hormonas na indução da ovulação em éguas: a gonadotrofina coriónica humana (hCG) e a hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH) (Morel, 1999; Ax *et al.*, 2004). A hormona mais utilizada é a hCG, numa dose de 2500 a 3500 UI, administrada por via endovenosa ou intramuscular, no terceiro dia do estro ou quando um folículo ovárico atinge 35 mm de diâmetro (Ax *et al.*, 2004; Costa, 2008). A ovulação ocorre cerca de 36 a 48 horas após a administração desta hormona. Para administração de GnRH estão disponíveis vários protocolos incluindo a administração intermitente, através de mini-bombas peristálticas de libertação contínua ou pulsátil, através de implantes de administração lenta e a administração em dose única (Costa, 2008; Morel, 1999). A maior desvantagem associada a esta terapêutica hormonal é a enorme variação na resposta entre éguas, havendo sempre o risco de as éguas responderem antecipadamente ao tratamento e serem inseminadas muito após a ovulação (Morel, 1999). Ainda assim, verifica-se que 83 a 89 % das éguas apresentam uma resposta positiva, ovulando após a administração destas hormonas. Devido à dificuldade em prever o momento exacto da ovulação após a administração de hCG, todas as éguas devem ser intensamente monitorizadas a cada 6 a 8 horas de modo a que sejam inseminadas na iminência da ovulação ou assim que esta seja detectada. Nesta avaliação, manual ou com recurso à ecografia transrectal, e quando a ovulação está iminente, são detectados, por norma, folículos pré-ovulatórios com 40 ou mais mm de diâmetro e o amolecimento do folículo 24 horas antes da ovulação (constatado não só por palpação mas também visível por ecografia como um achatamento e deformação do folículo quando em contacto com a sonda ecográfica). Verifica-se também um aumento da ecogenicidade da parede do folículo que ecograficamente aparenta ter “dupla membrana” e a formação de uma pequena evaginação no folículo dirigida para a fossa de ovulação. Imediatamente antes da ovulação observa-se a presença de hemorragia dentro do folículo (visualizada como pequenas partículas ecogénicas no fluido folicular normalmente anecogénico). Ocorre ainda uma redução do edema uterino cerca de 24 horas antes da ovulação (England, 2005).

### **1.5 Técnica de Inseminação Artificial**

Em qualquer inseminação artificial é recomendável que sejam sempre utilizados materiais estéreis, não tóxicos e descartáveis (Blanchard *et al.*, 2003; Ax *et al.*, 2004; Morel, 1999). As inseminações devem ser sempre realizadas de acordo com as técnicas de contaminação mínima, descritas por Kenney e colaboradores em 1975 (Blanchard *et al.*, 2003). A égua deve estar devidamente contida, idealmente numa manga à semelhança do que é feito para

uma palpação rectal, ecografia transrectal ou noutro tipo de procedimento de diagnóstico reprodutivo, com a sua cauda protegida por uma ligadura e desviada para cima ou para o lado, afastando-a da área perineal. A área entre a base da cauda e a comissura ventral da vulva deve ser minuciosamente higienizada, isto é, lavada, enxaguada e seca com papel seco, limpo e descartável, tendo-se particular cuidado na lavagem da vulva (Blanchard *et al.*, 2003; Ax *et al.*, 2004; Morel, 1999). Devem ser feitas duas ou três lavagens com sabão ou com uma solução iodada, eliminando-se posteriormente a espuma e os resíduos resultantes da lavagem, que são potencialmente irritantes para a membrana mucosa e que também são espermicidas, com uma passagem final de água (Blanchard *et al.*, 2003; Morel, 1999). Toda a sujidade e material fecal presente no vestíbulo caudal devem ser convenientemente removidas durante o processo de lavagem para evitar a contaminação do tracto genital cranial durante a inseminação (Blanchard *et al.*, 2003; Morel, 1999).

Antes de se proceder à inseminação propriamente dita, todo o sémen deve ser preparado, de acordo com o método de armazenamento (Morel, 1999).

Quando se pretende utilizar sémen congelado, este deve ser descongelado segundo o protocolo de descongelação apropriado normalmente fornecido pelo laboratório ou estabelecimento que processou o sémen (Morel, 1999). Na Lusopecus Lda., por norma, para sémen congelado no seu centro de recolha e congelação de sémen equino ou para doses de sémen congelado que não apresentem protocolo específico de descongelação, é utilizado um banho-maria à temperatura de 45°C durante 20 segundos para descongelação de palhinhas de 0,5 mL. São exemplo de outros protocolos de descongelação a utilização de banhos-maria à temperatura de 5°C durante 4 minutos, a 38°C durante 30 segundos ou a 75°C durante 7 segundos. Deve-se ter algum cuidado quando se descongelam simultaneamente várias palhinhas de 0,5 mL assegurando que as palhinhas não aderem umas às outras pois isso pode criar uma velocidade de descongelação irregular (Samper, 2007). Palhinhas maiores, de 2,5, 4 ou 5 mL, não descongelam de modo tão eficiente quando são utilizadas temperaturas elevadas por curtos períodos de tempo, sendo recomendada neste caso, a descongelação à temperatura de 50°C durante 45 segundos (Morel, 1999, Samper, 2007). Alguns autores sugerem a descongelação destas palhinhas a 37°C durante 2 minutos (Samper, 2007). Após descongelação, o sémen deve ser prontamente avaliado antes de ser inseminado.

Não existe nenhum protocolo para a avaliação de sémen congelado nem estão definidos quais os valores mínimos de qualidade da dose de sémen congelado a inseminar. Contudo, é aceite pela maioria dos laboratórios de congelação de sémen para fins comerciais que os critérios mínimos requeridos por uma dose inseminante são de 30 a 35% de espermatozóides com motilidade progressiva, 50% dos espermatozóides morfológicamente normais e uma concentração superior a 600 milhões de espermatozóides por dose

inseminante (Samper, 2007).

O sémen refrigerado não requer qualquer aquecimento antes da inseminação, devendo mesmo ser mantido refrigerado até à sua utilização porque este será rapidamente aquecido ao entrar em contacto com o útero da égua (Morel, 1999).

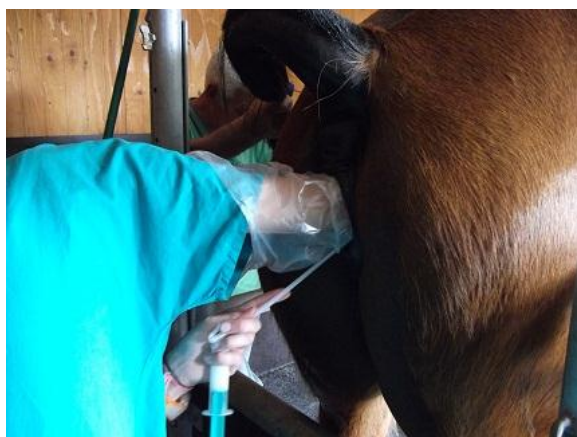
O sémen a utilizar em fresco também não necessita de nenhum tratamento térmico, sendo inseminado à temperatura corporal (Morel, 1999).

Após o processamento, o sémen é então colocado numa seringa limpa, seca e estéril. No caso do sémen congelado, o conteúdo das palhinhas após descongelação pode ser removido de várias formas: (1) directamente para a pipeta de inseminação e injectado de seguida no útero por propulsão com ar através da injeção de um pequeno volume de ar para dentro da pipeta com auxílio de uma seringa; (2) drenado para dentro de uma seringa que é posteriormente acoplada à extremidade distal da pipeta de inseminação; ou, (3) à semelhança do que é realizado na inseminação artificial de bovinos, pode-se colocar a palhinha acoplada directamente à pipeta e utilizar um estilete que percorre todo o comprimento da pipeta de inseminação artificial, empurrando assim o sémen para fora da pipeta directamente no lúmen uterino (Morel, 1999).

Existem dois métodos de introdução da pipeta no útero, podendo ser feita a passagem da pipeta de inseminação através do cérvix até ao útero com um braço colocado na vagina (figura 4) ou com um braço colocado no recto (Morel, 1999; Blanchard *et al.*, 2003; Samper, 2007).

Qualquer que seja o método empregue, é sempre utilizada uma pipeta de inseminação de 22 polegadas, estéril (Ax *et al.*, 2004). É essencial que todo o equipamento utilizado esteja limpo, seco e estéril (Morel, 1999).

Figura 4 – Inseminação artificial com sémen fresco pela técnica transvaginal (original)



Para inseminar uma égua com a colocação do braço na vagina, é necessária a colocação de uma luva de palpação estéril no braço que efectua a inseminação (Blanchard *et al.*,

2003). A ponta da pipeta de inseminação é agarrada com a mão protegida, colocando-se de seguida uma pequena quantidade de gel lubrificante estéril e não espermicida nas costas da mão (Blanchard *et al.*, 2003). A quantidade de lubrificante deve ser minimizada ao máximo pois existem fortes evidências que alguns lubrificantes podem ser prejudiciais para a motilidade e viabilidade dos espermatozóides (Morel, 1999).

A mão e a pipeta de inseminação são então lentamente avançadas através do vestíbulo e vagina cranial, procedendo-se à identificação da abertura cervical utilizando o dedo indicador. Este dedo é posteriormente inserido no cérvix de modo a servir de guia para a pipeta de inseminação quando avança ao longo do cérvix até ao lúmen uterino (Blanchard *et al.*, 2003; Morel, 1999). A pipeta deve ser inserida no útero de modo a que sejam projectados pelo menos 2 centímetros do seu comprimento para dentro do lúmen uterino. É aconselhável que após a deposição do sémen, se tape a abertura cervical com os dedos durante alguns segundos para tentar reduzir as perdas de sémen por refluxo para a vagina (Morel, 1999).

Outra forma igualmente satisfatória consiste na passagem da pipeta de inseminação para o cérvix recorrendo-se à utilização de um espéculo iluminado, previamente colocado na vagina (Blanchard *et al.*, 2003).

Uma alternativa menos popular em reprodução equina consiste em guiar a pipeta de inseminação através do recto. Neste caso, o operador coloca uma luva de palpação normal e introduz o braço protegido no recto da égua, à semelhança do que é realizado numa palpação rectal ou ecografia transrectal. Com a mão que se encontra no recto localiza-se o cérvix e procede-se à introdução da pipeta de inseminação na vagina, guiando-a até ao cérvix e ao longo desta estrutura (Morel, 1999). Este método, embora de execução mais complexa, tem a vantagem de reduzir o risco de contaminação do tracto reprodutivo da égua por não se introduzir o braço na vagina, havendo apenas uma invasão mínima das barreiras físicas do tracto reprodutivo pela pipeta de inseminação (Morel, 1999). Este tipo de inseminação é mais utilizado na inseminação artificial com sémen congelado de fraca viabilidade quando se pretende efectuar uma deposição intracornual profunda no corno uterino ipsilateral ao ovário que continha o folículo ovulatório. Para tal, é comum recorrer à utilização de pipetas de inseminação com ponta flexível, facilitando assim a sua orientação até ao fundo do corno uterino. Vários autores relatam também que ocorre uma melhoria significativa das taxas de concepção quando se procede à inseminação intracornual profunda de sémen de baixa concentração espermática.

Em ambos os casos, após colocação da pipeta de inseminação, é acoplada à sua extremidade distal a seringa que contém o sémen que é então projectado para dentro da pipeta e lentamente depositado no lúmen uterino (Blanchard *et al.*, 2003; Morel, 1999).

É importante que seja depositado todo o conteúdo da seringa, particularmente no caso de

ejaculados de volume reduzido ou de menor qualidade. Assim sendo, após ejeção de todo o sémen contido na seringa, deve-se enchê-la com um um pequeno volume de ar, 5 a 7 cm<sup>3</sup>, e injectá-lo para dentro da pipeta de inseminação de modo a que o sémen remanescente na pipeta seja empurrado para o lúmen uterino (Morel, 1999).

Após a inseminação artificial, as éguas são novamente colocadas no seu ambiente natural, não requerendo nenhum cuidado adicional. É aconselhável a sua monitorização decorridas 12 a 24 horas para assegurar que a égua ovulou convenientemente e verificar a eventual presença de exsudados inflamatórios ou acumulações de líquido intra-uterino. Esta situação deve ser avaliada particularmente após inseminação artificial com sémen congelado, em éguas velhas, éguas com mecanismos de limpeza uterina retardados ou susceptíveis a infecções uterinas. Se a égua não tiver ovulado deve-se proceder novamente à sua inseminação.

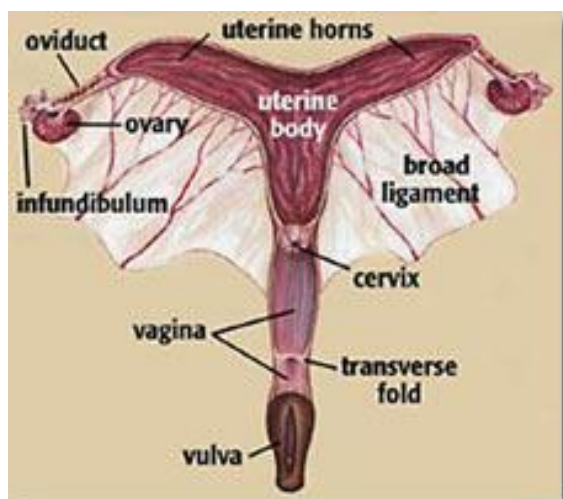
Após confirmação da ovulação, se necessário, pode-se proceder à sutura de Caslick em éguas com conformação perineal que o justifique, como por exemplo éguas com Índice de Caslick superior ou igual a 150 e a coaptação dos lábios vulvares comprometida. Podem também ser instituídas terapêuticas como a lavagem uterina com soro salino estéril, infusões intrauterinas de antibiótico e administração de ocitocina, nomeadamente em éguas com diagnóstico de endometrite (Samper, 2007).

## 2 O ÚTERO

### 2.1 Breve revisão anatômica

O útero é um órgão muscular oco que une a vagina às trompas de Falópio. O útero da égua é normalmente descrito como uma estrutura em forma de “T” ou “Y” e é constituído por dois cornos, um corpo e um cérvix (figura 5) (Blanchard *et al*, 2003, England, 2005).

Figura 5 – Representação esquemática do útero de uma égua (Peterson, 2011)



O corpo é cilíndrico, achatado dorsoventralmente, possui em média 18 a 20 cm de comprimento e 8 a 12 cm de diâmetro e estende-se cranialmente no plano ventral da cavidade pélvica e no abdômen caudal localizando-se, normalmente, dorsal, dorso-lateral ou lateral à bexiga, logo, a sua posição pode ser alterada pelo grau de distensão da bexiga ou do intestino (England, 2005; Bergfelt, 2009; Ley, 2004). Os cornos uterinos encontram-se localizados na cavidade abdominal. São normalmente simétricos, possuem em média entre 20 a 25 cm de comprimento e bifurcam-se lateral ou dorso-lateralmente na extremidade cranial do corpo uterino. O seu diâmetro na base é de cerca de 4-6 cm e é menor nas suas pontas (1 a 2 cm) (England, 2005; Morel, 2003; Kainer, 2011; Ley, 2004). Os cornos uterinos, nas éguas gestantes, perdem a sua simetria. O lúmen de cada corno uterino termina no óstio uterino da Trompa de Falópio, que se abre numa pequena papila no endométrio na extremidade de cada corno uterino. A junção entre o corpo e cornos uterinos possui um esfíncter de fibras musculares que servem de válvula, prevenindo o refluxo do conteúdo uterino para o óstio uterino (Kainer, 2011; Ley, 2004).

*In situ*, antes da manipulação, as paredes dos cornos e corpo uterino são flácidas, com consistência semelhante à das ansas intestinais. A manipulação provoca a contracção rápida do músculo uterino e, conseqüentemente, a redução de tamanho e um aumento do diâmetro dos cornos uterinos por perda da sua forma cilíndrica (Morel, 2003; Kainer, 2011).

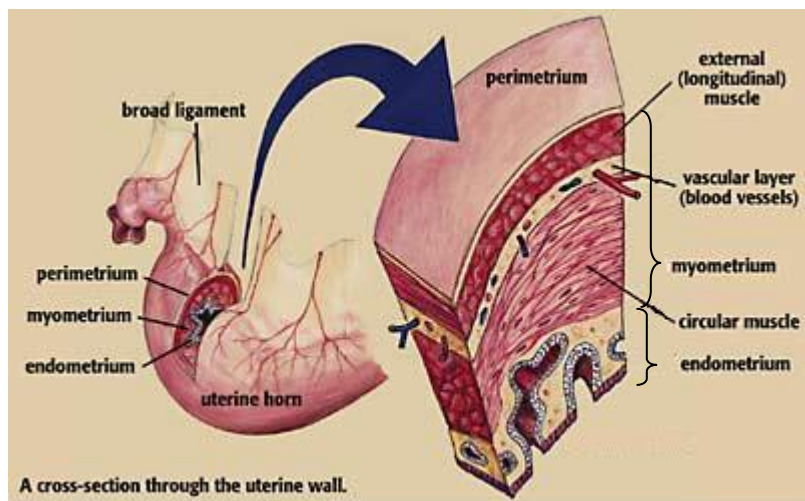
O útero possui também um pequeno septo mediano que marca a bifurcação entre o corno uterino direito e esquerdo na sua junção com o corpo uterino (Kainer, 2011; Ley, 2004).

O ligamento intercornual, presente na superfície serosa do útero da égua, é menos proeminente quando comparado com outras espécies pecuárias não devendo ser utilizado como auxiliar para retraindo o útero para a cavidade pélvica durante a palpação rectal (Ley, 2004).

Este órgão encontra-se ligado à região lombar e suspenso na cavidade pélvica e abdômen caudal por dois ligamentos peritoneais transversais, denominados de ligamentos largos. Estes ligamentos são divididos em três áreas: o mesométrio, representa a maior porção do ligamento largo e na égua encontra-se ligado à superfície dorsal dos cornos uterinos, estendendo-se lateral e caudalmente pelo corpo uterino e cérvix; a mesosalpinge, ligada as trompas de Falópio; e o mesovário, ligado aos ovários (Morel, 2003; Kainer, 2011). Para além da sua função física, os ligamentos largos funcionam como corredores para os vasos sanguíneos, linfáticos e nervos (Bergfelt, 2009; Ley, 2004), e são compostos por tecido conjuntivo laxo e tecido adiposo (Ley, 2004). O útero é irrigado em ambos os lados por três artérias (ramo uterino da artéria vaginal, artéria uterina e ramo uterino da artéria ovárica) e veias correspondentes (Blanchard *et al*, 2003). Contudo, não recebe qualquer inervação sensorial (Ley, 2004).

A parede uterina é constituída por três camadas: uma camada serosa externa, o perimétrio, contígua com os ligamentos largos; uma camada central muscular, o miométrio; e uma membrana interior mucosa, o endométrio. As duas primeiras são contínuas com a vasculatura e musculatura do mesométrio (Figura 6) (Kainer, 2011; Blanchard *et al*, 2003).

Figura 6 – Representação esquemática de uma secção transversal da parede uterina evidenciando as camadas que a constituem (Adaptado de Peterson, 2011)



O miométrio consiste numa camada muscular espessa e é composto por uma camada externa de fibras musculares longitudinais, uma camada central vascular (o estrato vascular) e uma camada interna de fibras musculares circulares (Morel, 2003; Blanchard *et al*, 2003). É responsável pelo tônus uterino, pela capacidade de expansão uterina durante uma gestação e providencia a força de expulsão durante o parto (Morel, 2003; Blanchard *et al*, 2003).

O endométrio apresenta-se sob a forma de 12 a 15 pregas orientadas longitudinalmente compreendendo um epitélio simples, colunar, de células com forma que pode variar de cubóide a prismática dependendo da fase do ciclo éstrico, tornando-se este epitélio pseudo-estratificado durante o estro (Kainer, 2011; Ley, 2004). Algumas das células podem ser ciliadas (Kainer, 2011). Compreende a estroma da lâmina própria de natureza conjuntiva e as glândulas endometriais. As pregas endometriais e as pressões exercidas sobre o útero pelos órgãos que o rodeiam provocam uma obliteração quase completa do lúmen uterino (Morel, 2003; Blanchard *et al*, 2003; Kainer, 2011; Ley, 2004). O endométrio é o principal responsável por assegurar o desenvolvimento do conceito e participa na implantação e desenvolvimento da placenta (Morel, 2003).

A espessura das paredes do útero, e o tônus do miométrio, variam significativamente com o estado reprodutivo e com a idade (England, 2005). O tamanho do útero é também afectado pela idade da égua e pelo número de gestações, tendendo a ser consideravelmente maior



em éguas velhas múltiparas (Morel, 2003). A gravidez provoca uma distorção acentuada da forma do útero (England, 2005).

## **2.2 Métodos de avaliação das características uterinas**

São vários os métodos complementares de diagnóstico utilizados para avaliar as características uterinas.

Neste capítulo serão abordados os principais métodos utilizados na avaliação uterina num programa de IA: a palpação rectal, a ecografia transrectal, a cultura endometrial, a citologia endometrial e a biópsia endometrial.

### **2.2.1 Palpação Rectal**

Uma das capacidades mais importantes para que um médico veterinário seja bem sucedido em reprodução equina, é saber fazer uma palpação rectal exímia do tracto genital interno. Este exame deve fazer parte da avaliação reprodutiva inicial de todas as éguas (Sertich, 2007; Carleton, 2007).

Quando realizado por um examinador experiente, este procedimento é um meio pouco dispendioso e eficaz de adquirir conhecimentos valiosos relativos ao estado e integridade reprodutiva de uma égua. Providencia a informação básica necessária para tomar decisões relacionadas com o recurso a meios de diagnóstico, testes laboratoriais ou modalidades de tratamento adicionais (Bowman, 2011).

O seu objectivo não é simplesmente localizar e identificar os órgãos reprodutivos, mas também avaliar a capacidade reprodutiva e o estado endócrino da égua através de uma interpretação adequada dos achados de palpação (Bowman, 2011).

É extremamente importante que sejam tomadas todas as medidas de segurança antes da sua execução e que a égua esteja adequadamente contida antes do procedimento, de modo a evitar lesões tanto da égua como do Médico Veterinário e dos os ajudantes presentes (Blanchard et al., 2003; Bowman, 2011).

A escolha do local a utilizar para efectuar a palpação deve ser feita tendo em conta o temperamento da égua e a experiência do ajudante que a segura, devendo idealmente ser sempre um local seco e bem iluminado. Sempre que possível as éguas devem ser colocadas numa manga (Bowman, 2011).

Antes de qualquer palpação dos órgãos genitais internos devem ser removidas todas as fezes da ampola rectal.

O examinador deve, durante todo o processo, utilizar uma luva de palpação rectal generosamente lubrificada sendo frequentemente utilizado para este efeito um lubrificante não estéril à base de água e metilcelulose (Sertich, 2007).

Após o esvaziamento do recto, o examinador deve colocar o seu braço novamente no recto da égua, até sensivelmente 30 a 40 cm após o bordo pélvico cranial, que geralmente corresponde ao seu cotovelo, recuando de seguida até que a sua mão encontre a bifurcação dos cornos uterinos. Por vezes o útero encontra-se macio, achatado e flácido sendo mais difícil de identificar (Taylor *et al.*, 2010; Carleton, 2007). Para confirmar que se trata mesmo do útero pode-se pinçar a parede uterina para sentir o efeito de “dupla camisa”, i.e. quando se alivia a tensão da pinça dos dedos sente-se largar as duas paredes uterinas, individualmente, e sentir as pregas endometriais longitudinais (Taylor *et al.*, 2010).

A palpação rectal deve ser realizada de forma sistemática, palpando sempre o cérvix, corpo e cornos uterinos e os ovários, avaliando-os quanto à sua forma, tamanho, consistência e conteúdo, não devendo nenhuma parcela do tracto genital ser avaliada sem que seja relacionada com o todo (Carleton, 2007; Blanchard *et al.*, 2003). A ausência de alguma destas estruturas pode sugerir uma anomalia congénita ou pode resultar de um procedimento cirúrgico (e.g. ovariectomia) (Carleton, 2007).

O útero de uma égua não gestante apresenta-se com a forma de “T” ou “Y” e é constituído por um corpo, dois cornos uterinos e cérvix. Pode encontrar-se posicionado tanto no canal pélvico como na cavidade abdominal, cranial e/ou ventral ao bordo pélvico (Sertich, 2007). Um útero não grávido está normalmente localizado parcialmente na cavidade abdominal posterior e no canal pélvico (Bowman, 2011). Os cornos uterinos e os ovários encontram-se suspensos pelos ligamentos largos, mesométrio e mesovário respectivamente, entre as tuberosidades coxais. Os ovários localizam-se, normalmente, laterais e ligeiramente ventrais em relação à extremidade dos cornos uterinos, sendo dotados de alguma mobilidade passiva (Carleton, 2007).

A avaliação inicial do útero é feita através da sua suspensão com a mão em concha e a ponta dos dedos a suportar a superfície ventral do útero (Bowman, 2011). Deve ser sempre palpado na sua totalidade, deslizando a mão de uma ponta de um dos cornos uterinos até à extremidade do corno contra-lateral, o que permite uma estimativa rápida e geral do tamanho, da simetria entre os cornos e da eventual presença de quistos, de fluido intrauterino ou de massas intrauterinas (Blanchard *et al.*, 2003; Sertich, 2007; Bowman, 2011). Geralmente uma disparidade no tamanho dos cornos uterinos é indício de que a égua está gestante (Bowman, 2011). Deve-se também verificar sempre a superfície ventral do útero para averiguar a possibilidade de existência de um eventual aumento de volume na junção corpo-corno, que pode ser devido a quistos endometriais ou, mais frequentemente, a uma distensão linfática (Taylor *et al.*, 2010). O tónus e consistência são melhor apreciados através da captura e ligeira compressão do útero pelos dedos indicador e polegar, devendo igualmente ser sempre feita uma avaliação sistemática de todo o órgão (Bowman, 2011).

O útero de uma égua em anestro tende a ser flácido com paredes finas. Durante o estro

tende a ficar edematoso, com paredes espessadas, mais distendido e um pouco túrgido. Já no diestro, a progesterona vai provocar um aumento significativo do tónus uterino ficando os cornos uterinos com uma forma redonda, firmes e tubulares (Sertich, 2007).

Muitas alterações uterinas podem ser detectadas por palpação rectal, incluindo a atrofia das pregas endometriais, a atrofia localizada da musculatura uterina, a presença de quistos linfáticos, de tumores uterinos e/ou de grandes quantidades de material purulento ou de outro fluido anormal no lúmen uterino (Blanchard *et al.*, 2003).

Antes de avançar para qualquer procedimento intrauterino deve-se sempre primeiro confirmar, por palpação rectal, se a égua está ou não gestante, pois a maioria destes procedimentos são prejudiciais para a manutenção de uma gestação, sendo passíveis de provocar abortos ou placentites ascendentes (Sertich, 2007).

### **2.2.2 Ecografia Uterina**

A avaliação ecográfica é uma componente essencial, importantíssima na avaliação não invasiva do tracto reprodutivo da égua, nomeadamente do útero e dos ovários (Pycock, 2011).

Foi em 1980 que pela primeira vez foi referida a ecografia em tempo real como sendo um método de diagnóstico valioso para a reprodução equina. Desde então, as aplicações da ecografia de diagnóstico expandiram muito nesta área ao ponto de o ecógrafo ser, hoje em dia, um instrumento fundamental e quase indispensável, tanto para o Médico Veterinário como para os investigadores (Blanchard *et al.*, 2003).

Embora a tecnologia que está por detrás de um ecógrafo seja bastante complexa, a sua utilização é relativamente simples para um clínico treinado, requerendo apenas bons conhecimentos sobre palpação rectal e conhecimentos básicos sobre os princípios da ecografia e da aparência anatómica à ecografia do tracto reprodutivo de uma égua (Blanchard *et al.*, 2003).

A ecografia pode ser utilizada com vários intuitos, como avaliar o tamanho, forma e número de folículos pré-ovulatórios, observar alterações ecográficas (fisiológicas ou patológicas) no folículo pré-ovulatório, examinar a localização, morfologia e desenvolvimento do corpo lúteo e estimar a fase do ciclo éstrico (particularmente o estro). Permite ao Médico Veterinário efectuar também diagnósticos de ovulação ou falha da ovulação, alterações ováricas, como neoplasias ou quistos ováricos ou periováricos, bem como efectuar diagnósticos de gestação, estimar a idade do concepto e monitorizar o desenvolvimento fetal, efectuar o diagnóstico e manejo de gestações gemelares, de mortalidade embrionária precoce iminente ou efectiva e de processos patológicos envolvendo o útero, incluindo presença de fluido intra-uterino, quistos uterinos, pneumoútero, hematomas e neoplasias (Pycock, 2011).

Como referido anteriormente, antes de qualquer procedimento ecográfico, deve ser sempre feita primeiro uma avaliação manual minuciosa dos órgãos genitais internos, por palpação rectal. Este procedimento serve de orientação, providenciando toda a informação necessária acerca da forma, textura e tamanho de cada componente do tracto reprodutivo e assegurando que toda a matéria fecal é convenientemente removida, o que facilita muito a posterior localização rápida destes órgãos, durante o exame ecográfico (Pycock, 2011; Taylor *et al.*, 2010). Deve ser tomado todo o cuidado para evitar a entrada de ar para dentro do recto durante a manobra de esvaziamento porque o ar vai impedir a transmissão eficaz dos ultrasons para as estruturas que o rodeiam (Blanchard *et al.*, 2003).

Para proceder da forma mais correcta e segura a um exame ecográfico deste tipo, a égua deve encontrar-se devidamente contida, o que normalmente é conseguido com recurso a uma manga. Em alguns casos pode verificar-se a necessidade de utilizar um método adicional de contenção, como o aziar (Pycock, 2011). Se a égua resistir excessivamente ao procedimento o exame deve ser interrompido, procedendo-se então à sedação da égua ou, em casos mais raros, à realização de uma anestesia epidural. Em qualquer dos casos, o tracto genital deve ser examinado assim que se verifique que é seguro continuá-lo, de modo a prevenir o pneumorecto, que surge como consequência inevitável do relaxamento do esfíncter rectal (Blanchard *et al.*, 2003). Os poldros lactentes devem ser colocados à frente ou ao lado das suas mães (Pycock, 2011).

Podem ser utilizadas sondas entre os 2 e os 10 megahertz (MHz), mas numa ecografia do tracto reprodutivo da égua, são preferencialmente utilizadas sondas lineares, de 5 MHz (Pycock, 2011; Sertich, 2007; Taylor *et al.*, 2010). Este tipo de sondas é mais versátil, sendo perfeitamente adequadas para o exame ecográfico de éguas vazias e recentemente gestantes (Taylor *et al.*, 2010). Quanto menor for a frequência, maior é a capacidade de penetração das ondas sonoras nos tecidos e, como tal, pior é a resolução obtida. Assim sendo, sondas menos potentes, por exemplo de 3,5 MHz, são mais adequadas na monitorização de gestações mais avançadas e no exame de úteros no início do período pós-parto (Taylor *et al.*, 2010). Sondas mais potentes, de 5 a 10 MHz, possuem uma melhor resolução mas são muito limitadas quanto à sua capacidade de penetração dos tecidos, sendo mais indicadas quando se pretende fazer um estudo mais pormenorizado das estruturas uterinas e ováricas (Sertich, 2007, Blanchard *et al.*, 2003).

Como medida meramente higiénica, é aconselhável que a sonda esteja protegida por uma luva de palpação antes da sua utilização, colocando-se nesta um pouco de gel lubrificante não estéril para maximizar o contacto entre a sonda e a luva, evitando a interferência do ar presente entre as duas estruturas, para que o sinal ecográfico não seja prejudicado (Pycock, 2011).

A qualidade da imagem ecográfica depende muito da experiência do operador. É, portanto,

muito importante que este saiba como otimizar a qualidade da imagem utilizando os vários controlos do ecógrafo disponíveis, como o brilho, contraste ou frequência. Para tal, idealmente, o ecógrafo deve encontrar-se colocado à altura dos olhos do operador e o painel de controlo facilmente acessível ao mesmo (Pycock, 2011).

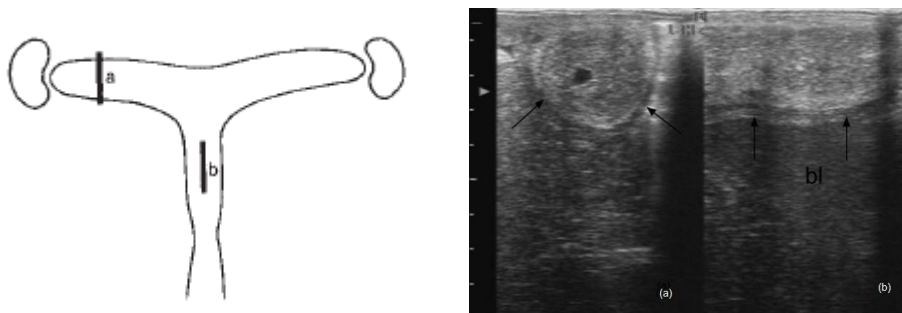
Num exame ecográfico deve ser sempre utilizada uma abordagem sistemática e metódica (Blanchard *et al.*, 2003).

A sonda deve ser protegida pela mão em forma de concha, com os dedos sempre na sua frente, não só quando é introduzida no recto, como também durante todo o procedimento, de modo a proteger a mucosa rectal de possíveis lesões (Taylor *et al.*, 2010; Pycock, 2011).

Como o útero da égua tem a forma de “T”, a sonda é normalmente orientada dentro do recto no plano longitudinal em relação ao corpo uterino para que seja obtido um corte sagital do corpo uterino e cérvix (Figura 7) (Pycock, 2011; Taylor *et al.*, 2010). Quando se examina o corpo uterino é muito importante que se avance, recue e desloque a sonda para ambos os lados para que o útero seja observado em toda a sua extensão (Pycock, 2011).

Para obter uma imagem dos cornos uterinos, a sonda deve ser rodada lenta e suavemente para a direita e depois para a esquerda, ou vice-versa. Assim que a sonda atinge a ponta do corno uterino, pode-se passar ao exame completo do ovário. Os cornos uterinos, no plano transversal, apresentam uma forma circular (Figura 7) (Pycock, 2011; Taylor *et al.*, 2010, Blanchard *et al.*, 2003). Estas estruturas devem também ser avaliadas em toda a sua extensão. Durante a observação pode ainda ser medido o diâmetro de cada corno uterino, na sua base (Sertich, 2007). Se porventura se tiverem dificuldades em encontrar os cornos uterinos, pode-se avançar ligeiramente a sonda e tentar localizar estas estruturas por palpação (Pycock, 2011).

Figura 7 – Representação esquemática do útero de uma égua em diestro, demonstrando a posição da sonda ecográfica em relação ao corno (a) e o corpo uterino (b) e a respectiva imagem ecográfica. Na imagem ecográfica do corno uterino (a) é visível uma pequena área anecogénica correspondente a um quisto uterino (Adaptado de England, 2005 e Carnevale e Olsen, 2011).



A égua, como animal poliéstrico, apresenta muitas mudanças fisiológicas do cérvix, útero e

ovários entre as fases de anestro, transição e o ciclo éstrico regular que podem ser averiguadas numa ecografia.

Um útero em anestro aparece pequeno e com ecogenicidade homogénea, a menos que a égua apresente quistos endometriais. Na secção transversal dos cornos uterinos, e longitudinal do corpo uterino, o útero aparece comprimido, achatado e irregular, podendo encontrar-se junto da bexiga ou do intestino (Carnevale e Olsen, 2011). A sua identificação por vezes pode ser difícil, especialmente quando se trata de éguas jovens com úteros extremamente pequenos (Samper, 2009).

Na fase de transição, o útero caracteriza-se pela visualização das pregas endometriais edematosas, com a aparência característica de uma "roda de carro" ou "gomos de laranja", particularmente entre meados e o término da fase de transição, durante vários dias ou mesmo semanas, sem que se verifiquem mudanças significativas. Em muitos casos, pode verificar-se a acumulação de uma pequena quantidade de líquido no lúmen uterino que tende a dissipar-se pelo útero devido ao aumento da espessura as pregas endometriais e consequente aumento significativo da superfície do útero. Esta fase é também caracterizada pela presença de múltiplos folículos ovários de grandes dimensões (25-35 mm ou superiores) (Samper, 2009).

A aparência do útero também varia durante o ciclo éstrico normal. Como tal, a ecotextura uterina pode ser utilizada como factor de diferenciação entre o estro e o diestro.

Durante o estro, a égua encontra-se sob a influência do estrogénio produzido pelos folículos ovários em crescimento. Esta hormona é responsável pelo aparecimento progressivo de edema dos tecidos do tracto reprodutivo, consequentemente, os cornos e corpo uterinos apresentam um padrão característico heterogéneo onde as pregas endometriais exibem bordos hiperecogénicos e centro hipoecogénico, correspondendo as áreas hipoecogénicas ao edema das pregas endometriais. O padrão em "gomos de laranja" ou "roda de carro" é evidente quando é observado um corte transversal dos cornos uterinos (Taylor *et al.*, 2010; Blanchard *et al.*, 2003; Carnevale e Olsen, 2011). O aparecimento e desaparecimento do edema endometrial é um fenómeno progressivo intimamente relacionado com os níveis de estrogénio e de progesterona. Quando os estrogénios atingem o seu nível máximo, com a aproximação do momento da ovulação, a intensidade do edema tende a diminuir progressivamente, sendo praticamente indetectável no momento da ovulação (Samper, 2009). Normalmente este edema desaparece por completo às 24 horas após a ovulação. À semelhança da fase de transição, pode ocasionalmente ser observada uma pequena acumulação fisiológica de líquido anecogénico no lúmen uterino (Sertich, 2007; Blanchard *et al.*, 2003). No entanto, a maioria das acumulações de líquido não associadas à gestação é considerada anormal, podendo ser um sinal clínico evidente de endometrite. Este líquido pode variar entre o anecogénico e o ligeiramente hiperecogénico (Sertich, 2007). O pico de

heterogeneidade uterina ocorre aproximadamente 1 a 3 dias antes da ovulação, começando a diminuir no dia que antecede a ovulação e recuperando o seu aspecto homogêneo 1 a 3 dias após a ovulação (Blanchard *et al.*, 2003).

No diestro, o útero apresenta uma ecotextura mais homogênea. Normalmente não se consegue diferenciar o lúmen uterino das pregas endometriais, sendo o lúmen uterino muitas vezes apenas identificado na secção longitudinal como uma linha tênue, hiperecogénica, devido a aposição das superfícies dorsal e ventral do endométrio (Taylor *et al.*, 2010; Blanchard *et al.*, 2003; Carnevale e Olsen, 2011). Pode também ser observado um ligeiro edema no final do diestro resultante do declínio dos níveis de progesterona e do aumento do estrogénio circulante (Carnevale e Olsen, 2011).

É importante que se recorra a algum tipo de sistema de pontuação com o intuito de reduzir a subjectividade da avaliação do edema uterino, para registar e identificar as alterações presentes, e para determinar os padrões de edema endometrial, tornando assim a avaliação do edema uterino mais objectiva. Para este efeito pode ser utilizado um sistema de classificação com sinais positivos (por exemplo, +, + +, + + +) ou um sistema numérico (Samper, 2009). Samper (2009) refere utilizar, na sua prática, uma pontuação numérica semi-subjectiva variando entre os grau 0 e 5 para classificação do edema endometrial, representando o grau 0, um útero homogêneo sem edema, e o grau 5, um útero com edema máximo (Figuras 8 a 13).

Uma égua normal teria edema de grau 0 (Figura 8) durante o diestro, e o grau 4 (Figura 12) seria o grau máximo de edema normal. Éguas que não exibam edema uterino com níveis de progesterona basais devem ser consideradas anormais. A classificação de edema uterino de grau 5, hiperedema (Figura 13), é utilizada quando se considera um edema anormal. Neste caso, as pregas endometriais são anormalmente grossas, fazendo o útero perder a arquitectura normal de “gomos de laranja”. Este edema persiste mesmo após a ovulação e, portanto, podem ser encontrados folículos de qualquer dimensão, embora na sua maioria sejam grandes e de tamanho pré-ovulatório (Samper, 2009).

Figura 8 – Edema uterino grau 0 – Ecotextura endometrial típica de um útero sob influência da progesterona: útero homogêneo (Samper, 2009).



Figura 9 – Edema uterino grau 1. Embora não se observe uma individualização das pregas endometriais, a heterogeneidade é evidente (Samper, 2009)

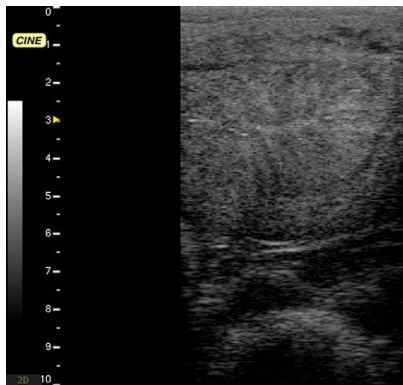


Figura 10 – Edema uterino grau 2. Este grau é caracterizado pela visualização nítida das pregas endometriais, embora estas não sejam visíveis em todo o útero (Samper, 2009)

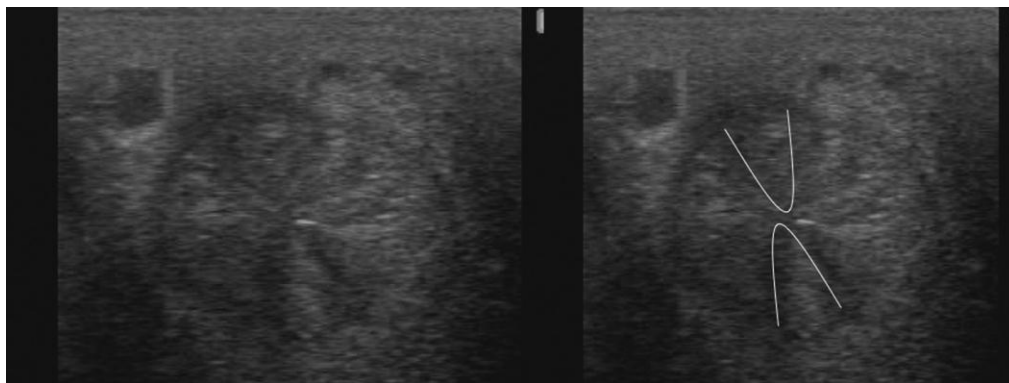


Figura 11 – Edema uterino grau 3. É nítido o padrão em “gomos de laranja” ao longo de todo o útero. Contudo, as pregas são ligeiramente hipoeecogênicas no centro (Samper, 2009)





Figura 12 – Edema uterino grau 4. Pregas endometriais proeminentes e mais espessas possuindo um bordo hiperecogénico (Samper, 2009)

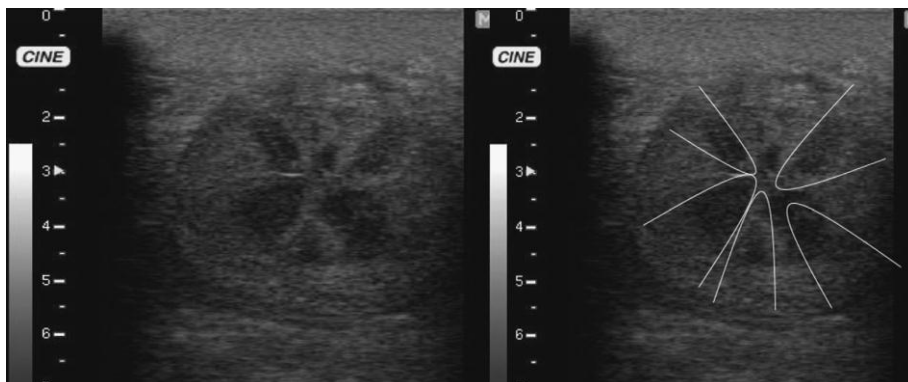
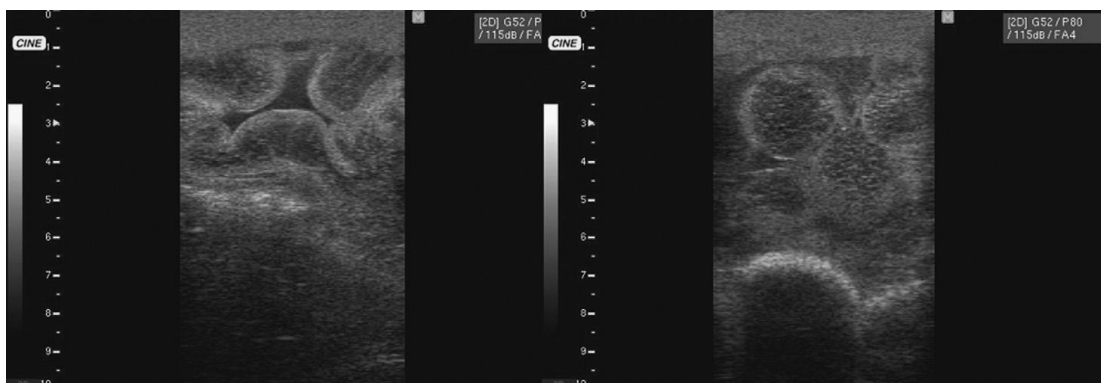


Figura 13 – Edema uterino grau 5 (hiperedema). Alteração da arquitectura normal do útero. Pregas muito espessadas, bordos hiperecogénicos e centro hipoecogénico. Pode ser detectado líquido em algumas áreas do útero, particularmente no corpo uterino e no cérvix (Samper, 2009)



A ecografia é também uma ferramenta extremamente útil no diagnóstico de patologias uterinas como os quistos uterinos, as acumulações de fluido no lúmen uterino e, mais raramente, na detecção de neoplasias, abscessos e massas periuterinas.

Os quistos uterinos podem ser visualizados como estruturas redondas e anecogénicas (Sertich, 2007). Podem possuir os mais variados tamanhos, desde microscópicos até vários centímetros de diâmetro, e ser uni ou multiloculares, tendo, quando compartimentalizados, trabéculas hiperecogénicas no seu interior. Estão mais comumente localizados no endométrio por terem origem linfática. Embora possam ser encontrados em qualquer zona do útero, há aparentemente uma certa predisposição para o seu desenvolvimento nas superfícies ventrais das junções corno-corpo. A sua identificação é extremamente importante não só por poderem ser facilmente confundidos com vesículas embrionárias com 10-11 dias durante um diagnóstico de gestação precoce, mas também por poderem ser responsáveis por um aumento significativo das perdas de gestação, especialmente quando atingem dimensões consideráveis ao ponto de interferirem com a mobilidade do conceito e com as

interacções endométrio-placenta (Blanchard *et al.*, 2003).

Embora a presença de um pequeno volume de fluido anecogénico durante o estro seja considerada fisiológica, a presença de grandes volumes de fluido, superiores a 1-3 centímetros (Figura 14), ou de um fluido ecogénico é considerada patológico. É também possível que mesmo ligeiras acumulações de líquido anecogénico possam ter efeitos adversos na fertilidade, particularmente quando ocorrem durante o diestro ou durante o período pós-parto imediato. Este tipo de acumulações de fluido são muito característicos da presença de uma endometrite (Blanchard *et al.*, 2003).

Figura 14 – Ecografia de acumulação de fluido intra-uterino (McKinnon e McCue, 2011)

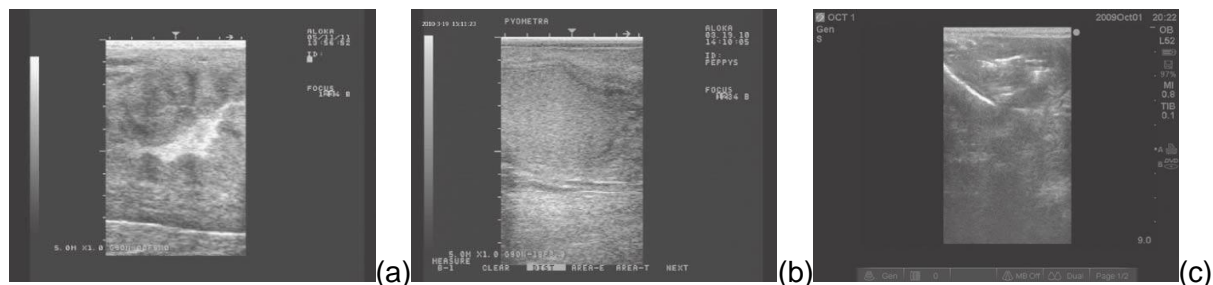


Apesar de ainda não ter sido identificada nenhuma correlação directa entre a ecogenicidade do fluido uterino e a severidade desta alteração, a ecogenicidade do fluido uterino está intimamente relacionada com a concentração de células inflamatórias e detritos (Sertich, 2007; Blanchard *et al.*, 2003). Assim sendo, se porventura se estiver perante uma urómetra (Figura 15-a), o fluido intra-uterino apresentar-se-á hiperecogénico devido à típica presença de cristais e muco na urina. Numa piómetra (Figura 15-b) o fluido intra-uterino é bastante celular e consequentemente muito ecogénico e a parede uterina aparece espessada. Quando associado a uma hidrómetra, resultante da aplasia segmentar dos ductos paramesonéfricos (canais de Müller) ou de um hímen não funcional, o fluido intra-uterino pode aparecer anecogénico (Sertich, 2007). A presença de áreas hiperecogénicas no lúmen uterino pode ser indicativa da presença de pneumoútero (Figura 15-c) (Blanchard *et al.*, 2003).

O edema uterino pode também ser indicativo de patologia uterina quando há um ou mais dos seguintes achados: (1) Presença de edema endometrial óbvio e de um folículo grande 14 a 15 dias após a ovulação, (2) presença de hiperedema durante o estro normal, (3) incapacidade de regressão do edema com a aproximação da ovulação e a presença de edema uterino pronunciado 24 horas após a ovulação, (4) aumento significativo no grau de

edema uterino 12 a 24 horas após coito/ inseminação, ou (5) falta de edema uterino durante o período de estro normal (Samper, 2009).

Figura 15 – Ecografia de égua com urómetra (a), piómetra (b) e pneumoútero (c) (McKinnon e McCue, 2011).



### 2.2.3 Cultura Uterina

A cultura uterina pode ser um meio de diagnóstico importante no fornecimento de informações valiosas sobre o potencial reprodutivo de uma égua, desde que seja correctamente obtida e interpretada (Blanchard *et al.*, 2003).

O objectivo deste exame complementar laboratorial é determinar se se encontram presentes microorganismos (i.e. bactérias ou fungos) na cavidade uterina (Blanchard *et al.*, 2003).

Para fazer um diagnóstico clinicamente significativo tem que ser sempre considerada a história reprodutiva da égua, a fase do ciclo éstrico, as terapêuticas ou manipulações uterinas prévias (incluindo cobrições/inseminações), o intervalo de tempo decorrido desde estes procedimentos, as características do útero e o histórico de avaliação de amostras de biópsia endometrial (Sertich, 2007).

Infelizmente é extremamente fácil ocorrer contaminação da amostra uterina com microorganismos provenientes do tracto genital caudal (cérvix, vagina, vestibulo e clítoris) ou do ambiente exterior (Blanchard *et al.*, 2003; Sertich, 2007). Foi demonstrado que a porção caudal do tracto genital possui, fisiologicamente, um número considerável de microorganismos, incluindo microorganismos potencialmente patogénicos para o útero como o *Streptococcus zooepidemicus* e a *Escherichia coli* (Sertich, 2007).

De modo a minimizar a contaminação da amostra é imperativo que a égua seja convenientemente preparada, procedendo-se à lavagem asséptica da zona perineal, ânus e área envolvente, ligando-se a cauda da égua (que é segurada para o lado) e esvaziando-se o recto de modo a reduzir a possibilidade de eliminação fecal e consequente contaminação da área perineal durante a recolha da amostra (Sertich, 2007; Blanchard *et al.*, 2003).

As zaragatoas devem ser obtidas e mantidas num ambiente o mais limpo possível, o que pode ser um grande desafio numa recolha em condições de ambulatório (Sertich, 2007). É

conveniente que se utilize uma zaragatoa protegida e equipamento estéril (Blanchard *et al.*, 2003).

Como referido anteriormente, antes do início de qualquer procedimento, independentemente da história fornecida, o Médico Veterinário deve certificar-se sempre se a égua se encontra ou não gestante (Sertich, 2007).

Podem ser utilizados dois métodos para recolha de amostras para cultura endometrial. O primeiro consiste em conduzir uma zaragatoa protegida, com protecção simples ou dupla, na vagina com a mão protegida por uma luva estéril lubrificada. O lubrificante é aplicado no dorso da mão e braço antes de estes serem introduzidos no vestíbulo e na vagina (Taylor *et al.*, 2010). O dedo indicador é colocado no lúmen cervical e a zaragatoa é guiada até ao lúmen uterino onde é então transposta a protecção e a zaragatoa colocada em contacto com o conteúdo uterino (Taylor *et al.*, 2010; Blanchard *et al.*, 2003). A zaragatoa deve então ser colocada de novo dentro da protecção antes de o conjunto ser removido do útero, minimizando assim a contaminação da amostra por agentes externos (Blanchard *et al.*, 2003). No caso da zaragatoa com dupla protecção procede-se da mesma forma que com a zaragatoa de protecção única com a diferença de que, quando o conjunto atravessa o cérvix, a protecção interior atravessa a protecção exterior e só então é que a zaragatoa transpõe a protecção interior, entrando em contacto com o conteúdo do lúmen uterino (Sertich, 2007). A segunda técnica utilizada consiste na colocação de um espéculo vaginal esterilizado que é passado pela zona cranial da vagina até ao cérvix. Com o auxílio de uma luz para iluminar a área, introduz-se uma zaragatoa estéril protegida, que por sua vez é conduzida através do espéculo e cérvix para dentro do lúmen uterino. Neste momento, a zaragatoa deve atravessar a protecção de modo a ser exposta ao conteúdo uterino. A zaragatoa deve igualmente ser recolhida primeiro para dentro da protecção e só depois ser removida do útero (Blanchard *et al.*, 2003).

Em ambos os casos, a zaragatoa deve ser deixada no lúmen uterino durante cerca de 30 a 60 segundos para absorver uma amostra do conteúdo uterino (Sertich, 2007).

Manipulações como esta que envolvem entrada de instrumentos dentro do útero são melhor realizadas durante o estro, não só porque o cérvix se encontra aberto e relaxado mas porque, nesta fase do ciclo éstrico, as éguas conseguem eliminar mais eficazmente a inevitável contaminação do útero (Taylor *et al.*, 2010). Crê-se que seja durante o estro que as defesas uterinas estejam no seu máximo (LeBlanc, 2011).

Se este procedimento for realizado durante o diestro, deve ser administrada uma dose luteolítica de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) para reduzir a possibilidade de contaminação e proliferação bacteriana no lúmen uterino (Taylor *et al.*, 2010). Efectivamente a hormona predominante no diestro é a progesterona, hormona esta que se sabe que possui propriedades imunossupressoras. Assim, a administração de  $PGF_{2\alpha}$  irá provocar a lise do

corpo lúteo, o que resulta na inibição da libertação de progesterona, reduzindo assim a sua concentração sérica e o seu efeito imunossupressor. Como consequência, há um aumento da produção da hormona luteinizante (LH) e da hormona foliculo estimulante (FSH), aumento este que provoca a indução do estro.

Para que a cultura reflecta de modo mais preciso possível a contaminação uterina, é recomendável que a zaragatoa seja prontamente colocada num meio de transporte (e.g. meio de Amies ou meio de Stuart) e só depois enviada para o laboratório (Blanchard *et al.*, 2003). Se existe a suspeita de uma endometrite fúngica deve ser pedida uma incubação em meio de Sabouraud (Sertich, 2007).

Estes meios mantêm a viabilidade dos microrganismos sem que haja sobrecrecimento bacteriano mesmo que passe muito tempo desde a recolha até à inoculação no meio de cultura (Blanchard *et al.*, 2003), tendo a capacidade de preservar os microrganismos por um período de 72 horas se a amostra for mantida entre os 15 e 30°C (Sertich, 2007).

O clínico pode preferir fazer as suas próprias culturas e, neste caso, devem ser utilizadas placas com meio de Agar Sangue a 5% e meio de MacConkey na inoculação da amostra uterina (Blanchard *et al.*, 2003).

Em éguas com endometrite clínica foram isolados muitos microrganismos, incluindo *Streptococcus sp. β-hemolitico* (mais frequente), *Streptococcus zooepidemicus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella sp.*, *Citrobacter sp.*, *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* (Sertich, 2007).

A de bactérias em cultura mista ou pura está sempre associada a sinais positivos de endometrite, tais como edema durante o diestro, a presença de fluido intrauterino, evidência de descarga uterina ou falha crónica na concepção (Sertich, 2007).

Na ausência de sinais clínicos positivos de endometrite, o isolamento de microrganismos, particularmente uma cultura mista, é normalmente indicativo de contaminação da zaragatoa uterina com microrganismos provenientes do tracto genital caudal (Sertich, 2007).

Considera-se que a cultura de muco cervical apresenta resultados duvidosos não reflectindo com precisão a presença de bactérias no lúmen uterino (Taylor *et al.*, 2010).

A realização de um teste de sensibilidade a antibióticos (TSA) é igualmente aconselhável, para que seja feita uma selecção mais apropriada do antibiótico a utilizar no tratamento da infecção uterina (Blanchard *et al.*, 2003).

O isolamento bacteriano não comprova necessariamente a presença de uma endometrite, assim como o não isolamento bacteriano não descarta a sua presença, pois por vezes a presença de inflamação não está associada à presença de microrganismos e vice-versa (Riddle *et al.*, 2007). Para minimizar qualquer má interpretação dos resultados, estes devem ser sempre comparados com resultados obtidos numa análise citológica ou numa biópsia endometrial porque, por si só, os resultados de uma cultura endometrial raramente são

suficientes para que seja feito um correcto diagnóstico de uma endometrite (Blanchard *et al.*, 2003; Sertich, 2007).

Nas situações em que não se conseguem isolar microrganismos do tracto genital de uma égua com sinais clínicos evidentes de endometrite utilizando a tradicional zaragatoa endometrial e posterior cultura aeróbia da amostra, pode ser adequado proceder a uma cultura baseada numa amostra de biópsia endometrial. A amostra é recolhida de modo semelhante ao procedimento para biópsia normal, sendo depois colocada num frasco estéril e coberta por água estéril. Deve arrefecer-se a amostra a 4°C e enviá-la para o laboratório em menos de 4 a 6 horas. Se a entrega no laboratório demorar mais que o tempo atrás referido a amostra deve ser colocada num frasco, sobre a superfície de um meio de cultura, e mantido à temperatura ambiente (Sertich, 2007).

#### **2.2.4 Citologia Uterina**

A citologia endometrial foi pela primeira vez descrita nos anos 60 (LeBlanc, 2011).

Esta técnica não substitui a avaliação histológica mas pode ser útil numa avaliação imediata das características do útero, baseada na presença ou ausência de células inflamatórias e na caracterização do tipo e número de células, e numa tomada de uma decisão rápida para beneficiação imediata de uma égua sem ser necessário esperar por resultados de biópsias ou de culturas uterinas (Sertich, 2007; Aguilar, 2006).

É recomendável que este exame seja realizado durante o estro, antes da monta ou inseminação, para assegurar que as éguas não têm nesse momento uma endometrite (Aguilar, 2006). No entanto, éguas que não apresentem sinais clínicos de endometrite, determinados por ecografia, não devem ser sujeitas por rotina à realização de citologias e/ou culturas uterinas (Taylor *et al.*, 2010).

Utilizando uma zaragatoa, e seguindo o mesmo método descrito para a cultura uterina, ou recorrendo a outro equipamento, podem obter-se células provenientes da cavidade uterina para avaliar a presença de uma possível resposta inflamatória activa que poderá ou não ser acompanhada por uma endometrite infecciosa (Blanchard *et al.*, 2003). A amostra pode ser obtida numa segunda colheita imediatamente após a recolha para cultura microbiológica (Carleton, 2007).

Se se raspar o endométrio com a ponta da zaragatoa ou se se utilizar uma ponta em escova pode-se obter uma amostra com maior celularidade (Sertich, 2007; Carleton, 2007).

A zaragatoa, após recolha da amostra, é rolada suavemente sobre uma lâmina de microscópio de modo a fazer um esfregaço por aposição. De seguida, o esfregaço é seco ao ar, identificado e corado, normalmente com uma coloração rápida de Wrigth Giemsa, um derivado da coloração de Romanowsky, como o kit Diff-Quik® (Blanchard *et al.*, 2003; Card,

2005).

A utilização de zaragatoas ou escovas na recolha de amostras para citologia tem a vantagem de serem realizadas com equipamentos facilmente disponíveis comercialmente e de serem obtidos resultados bastante precisos num curto espaço de tempo. A sua maior desvantagem consiste no facto de apenas serem obtidas amostras de uma pequena área do corpo uterino, havendo uma grande probabilidade de não se diagnosticarem infecções mais focais (LeBlanc, 2011).

Para além da zaragatoa pode também ser utilizada uma lavagem uterina com pequeno volume (50-100 mL) de uma solução salina estéril para recolha de uma amostra para citologia uterina. Esta técnica permite avaliar uma área maior da superfície uterina. No entanto, torna-se um procedimento muito mais incómodo porque requer um processamento suplementar da amostra. Nesta técnica os líquidos uterinos recolhidos necessitam de ser centrifugados ou deixados na vertical em repouso por algumas horas até as células sedimentarem. Se por um lado o número total de células é diluído em amostras não centrifugadas afectando o resultado obtido, os detritos presentes numa amostra centrifugada podem interferir com a identificação dos neutrófilos. Por esta razão, a utilização deste procedimento está normalmente limitada aos casos de éguas com infertilidade crónica (LeBlanc, 2011). Neste caso, os fluidos uterinos podem ser recolhidos por dois métodos. O primeiro método consiste em passar uma pipeta de inseminação através do cérvix, para dentro do corpo uterino instilando-se 50 mL de soro salino estéril com auxílio de uma seringa de 60 mL acoplada à extremidade distal da pipeta. A amostra é posteriormente recolhida aspirando o líquido novamente para dentro da seringa através da manipulação da ponta da pipeta com o dedo indicador, efectuando-se movimentos laterais e dorso-ventrais de modo a encontrar as bolsas de líquido. Devem ser tomados cuidados redobrados para não ferir a mucosa uterina. Com este método podem ser recuperados volumes entre 1 e 5 mL (LeBlanc, 2011). Alternativamente pode-se recorrer a outro método que consiste na colocação de um cateter de lavagem uterina no útero e instilação de 50 a 100mL de soro salino estéril no útero. Neste método o Médico Veterinário, após colocação do cateter, retira o braço da vagina e coloca-o no recto de modo a manipular o fluido ao longo do útero. Após 30 a 60 segundos o líquido é recuperado com auxílio de uma seringa (sucção) ou de um frasco de soro (gravidade) acoplado à extremidade distal do cateter, sendo então avaliado quanto à sua claridade, turvação e cor (LeBlanc, 2011).

Um líquido turvo ou transparente contendo laivos de muco está usualmente associado ao isolamento de bactérias, à presença moderada a intensa de detritos e à presença de células inflamatórias (LeBlanc, 2011).

Após o processamento do líquido de lavagem, é colocada uma gota da amostra sobre uma lâmina microscópica e feito um esfregaço que é depois fixado e corado exactamente como o

esfregação obtido com zaragatoa.

Em ambos os casos, as preparações citológicas coradas são então analisadas ao microscópio óptico quanto ao número total de células, a morfologia celular, ao tipo de células inflamatórias presentes, à presença de eritrócitos, microrganismos e células epiteliais, ao conteúdo do fundo do campo microscópico, nomeadamente a presença e quantidade de detritos, e, após acasalamento, quanto à presença de espermatozoides (Blanchard *et al.*, 2003; LeBlanc, 2011; Carleton, 2007). Bactérias e fungos podem ser observados tanto fora como dentro dos neutrófilos (Sertich, 2007).

A celularidade é avaliada contando todas as células presentes em 5 a 10 campos microscópicos (400x), fazendo depois a sua média, e através de uma avaliação semi-quantitativa da celularidade, categorizando a amostra como hipocelular, ligeiramente, moderadamente ou extremamente celular (LeBlanc, 2011).

As células epiteliais endometriais são as células mais comumente observadas numa citologia uterina normal. A sua forma varia entre o cubóide (anestro) e o prismático alto (estro). A maioria das células epiteliais não é ciliada, no entanto, podem ser observadas células epiteliais ciliadas no diestro, principalmente no Outono e aquando da presença de infecções crónicas.

As células escamosas são raras e normalmente estão associadas a contaminação cervical, podendo também ser observadas em zaragatoas no período pós-parto e em éguas com urómetra. Células epiteliais degeneradas são mais frequentemente observadas em esfregaços mal fixados, secos ao ar, ou em infecções crónicas com muito exsudado (LeBlanc, 2011).

Os neutrófilos são células inflamatórias recrutadas da circulação sistémica para o lúmen uterino em resposta a um antigénio (Carleton, 2007). São as células inflamatórias predominantes em éguas com endometrite, estando raramente presentes em éguas saudáveis quando as zaragatoas são recolhidas no estro ou antes do acasalamento. Vários autores afirmam que o endométrio saudável apresenta uma infiltração mínima de neutrófilos, sugerindo que estes são responsáveis pelo combate às infecções ascendentes por microrganismos provenientes das regiões mais caudais do tracto reprodutivo, principalmente do vestíbulo e da fossa clitoriana (Aguilar, 2006). Estas células podem estar presentes em amostras obtidas 2 a 3 dias após o acasalamento/ inseminação, após uma lavagem uterina, e no período pós-parto imediato, podendo apresentar-se bem preservadas ou degeneradas. A hipersegmentação do núcleo dos PMNs é uma observação frequente em éguas com uma resposta inflamatória uterina activa (LeBlanc, 2011). Relatos referem a presença destas células inflamatórias na vagina de éguas saudáveis mas ainda não está descrita a forma como estas podem influenciar os resultados de uma citologia endometrial. No entanto, verifica-se que existe uma maior probabilidade de contaminação em amostras recolhidas



através da utilização de técnicas sem protecção, tal como a recolha digital (Aguilar, 2006). No seu estudo, Aguilar (2006), verificou que a percentagem de neutrófilos na vagina de uma égua reprodutivamente normal é extremamente variável, podendo oscilar entre os 3 e os 56%, e também confirmou a presença de um número mais elevado de neutrófilos no cérvix, vagina e vestíbulo que no endométrio.

Os linfócitos, eosinófilos e macrófagos são tipos celulares pouco observados, podendo os linfócitos estar presentes em éguas com infecção fúngica crónica, pneumovagina severa e refluxo vestíbulo-vaginal. Também se encontram presentes em úteros de éguas submetidas a uma terapêutica intrauterina de um composto irritante ou em casos de alergia à ampicilina ou penicilina. A presença de eosinófilos numa citologia encontra-se associada a amostras obtidas de éguas com urómetra e pneumoutero crónico. Já os macrófagos são comumente observados em amostras obtidas poucos dias após o parto e em casos raros de endometrite crónica (LeBlanc, 2011; Carleton, 2007).

Os eritrócitos podem estar presentes em casos de amostras recolhidas no pós-parto ou devido a uma lesão da mucosa uterina durante a recolha (LeBlanc, 2011).

A morfologia das células epiteliais deve ser avaliada e classificada como intacta, distorcida, fragmentada ou degenerada (LeBlanc, 2011).

O fundo do campo microscópico é classificado como limpo ou contendo muco ou detritos, sendo a quantidade de detritos depois classificada como ligeira (<25% de ocupação do campo), moderada (25-75%) ou elevada (>75%). Uma presença de detritos moderada a elevada está normalmente associada ao isolamento de bactérias (LeBlanc, 2011).

A presença de cocos, bacilos, hifas fúngicas, esporos ou cristais de urina deve ser registada e avaliada com uma objectiva de imersão (1000x) (LeBlanc, 2011). As hifas fúngicas podem por vezes não ser identificadas devido à elevada contaminação por detritos espessos ou podem ser confundidas com lubrificante. Os esporos de leveduras podem variar de tamanho, forma e cor, apresentando-se normalmente com cor azul, preta ou castanha escura com um aro dourado a corar a sua cápsula (LeBlanc, 2011).

As preparações citológicas normais contêm conjuntos de células epiteliais ou células epiteliais individualizadas com aparência normal, poucos ou nenhuns eritrócitos e ausência de bactérias, fungos ou leveduras (Blanchard *et al.*, 2003). Se não forem observadas células epiteliais significa que a amostra não foi correctamente recolhida devendo-se proceder a uma segunda recolha (Carleton, 2007).

Quando necessário também pode ser efectuada uma coloração Gram do esfregaço. Esta coloração permitirá distinguir as bactérias Gram-positivas das Gram-negativas, providenciando informação clínica muito útil visto existirem poucos microrganismos tipicamente associados a uma endometrite equina. A presença de cocos Gram-positivos é consistente com uma contaminação por *Streptococcus sp.*  $\beta$ -hemolíticos. As bactérias Gram-

negativas tipicamente isoladas de éguas com endometrite incluem a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e a *Klebsiella pneumoniae* (Sertich, 2007).

O valor de uma citologia está normalmente limitado à comprovação de uma resposta inflamatória activa devido ao facto de os neutrófilos serem a componente celular intraluminal mais importante numa endometrite (Blanchard *et al.*, 2003).

No entanto, alterações inflamatórias mais subtis como por exemplo a endometrite crónica, não são detectadas com esta abordagem (Blanchard *et al.*, 2003).

Numa citologia, a inflamação uterina pode ser quantificada de várias formas (Tabela 1), sendo a técnica mais utilizada a contagem do número de neutrófilos em 10 campos microscópicos (400x), sendo expressos estes resultados como percentagem de neutrófilos em relação às células epiteliais (LeBlanc, 2011).

A percentagem de neutrófilos que constitui uma inflamação activa varia segundo os diferentes autores, entre 0,5 e 5%, sendo que muitos laboratórios consideram que uma razão de 1:40 (neutrófilos:células epiteliais) é um bom indicador de inflamação activa (LeBlanc, 2011).

Se se realizar a recolha de uma amostra com escova em vez de zaragatoa deve ser considerado uma relação de 1:20 porque com esta técnica é obtido um número mais elevado de células epiteliais do que com uma zaragatoa, sem que o número de neutrófilos por campo seja afectado (LeBlanc, 2011).

Tabela 1 – Métodos quantitativos de interpretação de amostras de citologia endometrial de equinos (Card, 2005)

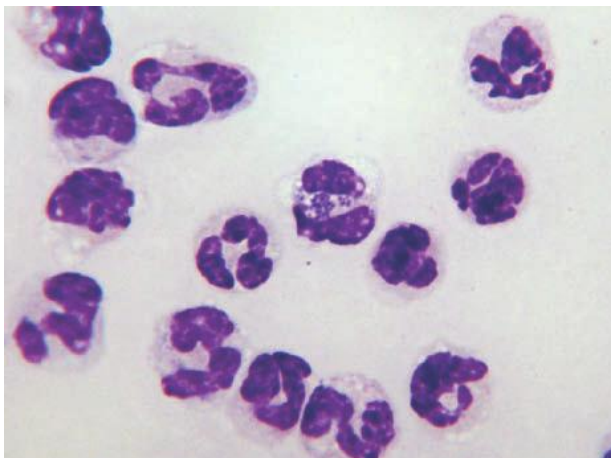
<b>Parâmetro</b>	<b>Autor (ano)</b>
> 1 neutrófilo em 5 campos (x240)	Knudsen (1964)
Relação de neutrófilos para células epiteliais	Digby e Ricketts (1978)
Relação de células epiteliais para neutrófilos > 10:1	Asbury (1982)
> 1 neutrófilo por cada campo de alta ampliação	Asbury (1984)
Neutrófilos para células epiteliais em 8 campos	Couto e Hughes (1984)
>5 neutrófilos em 10 campos	Brook (1985)
Relação de neutrófilos para células epiteliais	La Coeur e Sprinkle (1986)
< 15 células endometriais para 1 neutrófilo	Ley (1986)
≥ 3-10% das células são neutrófilos	Crickman e Pugh (1986)
≥ 2% das células são neutrófilos	Ball <i>et al</i> (1988)
≥ 1 neutrófilo por campo (x400)	Purswell (1989)
> 0,5% de neutrófilos	Ricketts e Mackintosh (1989)

Outro método de interpretar uma citologia endometrial é contar o número de neutrófilos em 10 campos microscópicos (400x) e categorizar o grau de inflamação como ausente (0-2 neutrófilos por campo), inflamação moderada (3-5 neutrófilos por campo) ou inflamação severa (>5 neutrófilos por campo) (LeBlanc, 2011).

A interpretação dos resultados pode ser complicada quando são observados neutrófilos sem que haja uma contaminação bacteriana associada (Carleton, 2007).

Citologias de éguas com endometrite aguda ou sub-aguda apresentam um número aumentado de leucócitos (figura 16), podendo também observar-se células epiteliais vacuolizadas e degeneradas (Blanchard *et al.*, 2003). Embora este procedimento não permita uma quantificação exacta do número de células, normalmente sempre que se encontra um neutrófilo por cada 5 campos microscópicos (400x) considera-se que se está perante uma situação patológica (Sertich, 2007). Em éguas com endometrite crónica também podem ser observados macrófagos e linfócitos (Sertich, 2007). A presença de cristais de carbonato de cálcio sugere a existência de uma urovagina e urómetra (Sertich, 2007; LeBlanc, 2011).

Figura 16 – Imagem microscópica de polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) obtidos numa citologia endometrial de égua com endometrite activa (Troedsson, 2011)



Embora seja uma ferramenta importante na detecção de uma resposta inflamatória, por si só, a citologia endometrial não permite identificar um agente etiológico. Por isso deve ser sempre realizada em associação com uma cultura endometrial com o objectivo de precisar a interpretação dos resultados obtidos (Carleton, 2007; Taylor *et al.*, 2010). Ainda assim, a citologia uterina consegue identificar duas vezes mais éguas com endometrite que a cultura endometrial (Riddle *et al.*, 2007). Nielsen (2005) concluiu com o seu estudo que a combinação de uma cultura bacteriana de uma amostra de biópsia endometrial com uma citologia endometrial é o método mais preciso e prático para diagnosticar a endometrite

equina.

### 2.2.5 Biópsia Uterina

A biópsia endometrial foi pela primeira vez estudada em 1925, quando Seaborn descreveu pela primeira vez as alterações macroscópicas e histológicas em úteros obtido em matadouro. No entanto estas conclusões nunca foram utilizados para fins de diagnósticos ou extrapoladas para éguas vivas de modo a definir um prognóstico (Love, 2011). Tobler<sup>1</sup>, em 1966, fez a primeira referência formal à “biópsia endometrial” enquanto meio complementar de diagnóstico que permite efectuar um prognóstico da fertilidade em éguas. No entanto, a base da avaliação de uma biópsia endometrial foi estabelecida graças ao trabalho desenvolvido por Brandt<sup>2</sup>, Kenney<sup>3</sup> e Ricketts<sup>4</sup> (Snider *et al.*, 2011).

Embora a ecografia transrectal, a palpação rectal e outras técnicas providenciem informações preciosas sobre a existência de patologia uterina, a avaliação histológica do endométrio por biópsia permanece, desde há 40 anos, o procedimento primordial na avaliação das características uterinas, essencial para a avaliação da competência reprodutiva de uma égua (Love, 2011; Snider *et al.*, 2011). É provavelmente o meio complementar de diagnóstico mais importante na avaliação do potencial reprodutivo de uma égua pois os seus resultados podem categorizar, de acordo com o prognóstico, a probabilidade de uma égua ficar gestante e de levar essa gestação a termo (Blanchard *et al.*, 2003). Esta correlação entre as características do endométrio e a capacidade de este manter uma gestação completa, na espécie equina, deve-se essencialmente ao facto da placenta equina apenas se encontrar plenamente funcional mais tardiamente do que, por exemplo, na espécie bovina. Deste modo, as secreções das glândulas endometriais aparentam ser importantes na manutenção do feto equino, pensando-se que a fibrose periglandular possa interferir com a função destas glândulas e, como tal, afectar negativamente a sobrevivência do concepto (Sertich, 2007).

Actualmente, a biópsia uterina é o único teste que permite detectar diversas alterações e avaliar a integridade estrutural do endométrio em relação a infiltração inflamatória, alterações fibróticas e dilatação tanto das glândulas endometriais como dos vasos linfáticos e alterações endometriais sazonais normais e anormais. Permite também a aquisição de informações relacionadas com a cronicidade, severidade e distribuição da endometrite (Sertich, 2007; Love, 2011; Blanchard *et al.*, 2003). A avaliação de uma biópsia é também um excelente método para monitorizar a resposta de uma paciente a um tratamento quando são diagnosticadas infecções ou outras alterações endometriais (Blanchard *et al.*, 2003).

Como se trata de um meio de diagnóstico que requer equipamento e laboratórios

---

<sup>1</sup>Tobler EE. Collection of uterine fluid and uterine biopsy. *Vet Med Small Anim Clin* 1966;61:779–88.

<sup>2</sup>Brandt GW, Manning JP. Improved uterine biopsy techniques for diagnosing infertility in mare. *Vet Med Small Anim Clin* 1969; 64:977– 83.

<sup>3</sup>Kenney RM. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *J Am Vet Med Assoc* 1978;172:241– 62.

<sup>4</sup>Ricketts SW. Endometrial biopsy as a guide to diagnosis of endometrial pathology in the mare. *J Reprod Fertil Suppl* 1975; 341–5.

especializados, e os seus resultados relativamente complexos não estão disponíveis de imediato porque requerem um maior processamento, a sua relevância prática está restringida apenas a casos especiais (Overbeck *et al.*, 2011). Então, a realização de uma biópsia está indicada em éguas com suspeita de alterações do endométrio, como éguas velhas ou éguas com história de complicações reprodutivas e na avaliação reprodutiva em acto de compra de éguas velhas com fertilidade desconhecida ou com história recente de terem ficado alfeiras apesar de sujeitas a um maneio reprodutivo adequado e terem sido cobertas por garanhões férteis (Love, 2011). Está também indicada em éguas com piómetra ou mucómetra (Snider *et al.*, 2011), éguas vazias que se encontram em anestro durante a época reprodutiva normal por assincronia fisiológica do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal e éguas velhas com história de realização de cirurgia reprodutiva (reparação cervical, urómetra ou remoção de quistos endometriais) (Love, 2011). A realização desta técnica está igualmente indicada em éguas com história recente de mortalidade embrionária precoce ou mortalidade fetal, éguas receptoras num programa de transferência de embriões e éguas cujos poldros têm grande valor (Snider *et al.*, 2011).

A única contra-indicação conhecida deste procedimento é a sua utilização em éguas gestantes ou recentemente cobertas, pois há o risco de ruptura das membranas fetais e de libertação de prostaglandinas (hormonas luteolíticas) e sangue para o lúmen uterino na sequência da remoção da porção de endométrio (Love, 2011). Alguns estudos demonstraram que recolhas diárias de amostras de biópsia endometrial resultam no aparecimento de sinais de estro associados a uma concentração sérica de progesterona inferior a 1 ng/mL (Snider *et al.*, 2011). É responsabilidade do Médico Veterinário averiguar a história reprodutiva da égua no que se refere a cobrições recentes, bem como avaliar o útero, por ecografia transrectal, para se assegurar que a égua não se encontra gestante antes de ser iniciado qualquer procedimento intra-uterino.

Uma biópsia endometrial pode ser obtida em qualquer fase do ciclo reprodutivo de uma égua não gestante. Pode mesmo ser executada durante o estro, imediatamente após uma cobrição, sem que, neste caso, interfira com o estabelecimento da gravidez (Sertich, 2007; Snider *et al.*, 2011). No entanto, obtém-se amostras com menor variabilidade durante o diestro (Snider *et al.*, 2011).

A égua tem de ser adequadamente contida e a cauda ligada e afastada da zona perineal. O procedimento de limpeza asséptico, a realizar após exame dos órgãos reprodutivos por palpação rectal, é o mesmo que o que é levado a cabo na recolha de uma amostra para citologia ou cultura uterina (Blanchard *et al.*, 2003),

Uma amostra para biópsia pode ser facilmente recolhida do endométrio fazendo passar um instrumento adequadamente desenhado para o efeito (pinça de biópsia uterina) através do cérvix, para dentro do útero (Blanchard *et al.*, 2003). Este procedimento não requer

anestesia ou tranquilização porque o útero equino não apresenta qualquer inervação sensorial (Sertich, 2007).

É muito importante que a tenaz da pinça de biópsia se encontre fechada quando é passada pela vagina e cérvix garantindo assim que é recolhida uma amostra significativa e pura de endométrio e que não são provocadas lesões noutras mucosas (Blanchard *et al.*, 2003). Quando a tenaz se encontra no interior do lúmen uterino, a mão que se encontra no tracto genital é retirada, sendo então inserida no recto até ao local onde se encontra a tenaz da pinça de biópsia, enquanto a outra mão segura o punho do instrumento. Utilizando a mão que está no recto, guia-se a tenaz de biópsia até ao local de recolha da amostra (Love, 2011). Esta amostra pode ser recolhida de qualquer local no corpo uterino, devendo-se no entanto preferir áreas de maior incidência de patologias previamente identificadas por avaliação manual e ecográfica. Se não forem observadas nenhuma alteração focal, o melhor local para remover a amostra é, regra geral, a superfície dorsal da junção corpo-corno uterino (Love, 2011; Snider *et al.*, 2011). Nesta altura abre-se a tenaz paralelamente a uma prega endometrial, e a parede uterina é então elevada ou pressionada para dentro da tenaz. Esta é posteriormente fechada de modo a que seja retirada uma pequena porção de endométrio (Blanchard *et al.*, 2003; Snider *et al.*, 2011).

Após a remoção da amostra endometrial ocorre inevitavelmente um pequeno sangramento que pode ser observado até alguns dias após o procedimento (Love, 2011).

A amostra é então colocada num fixador, como a solução de Bouin (combinação de formol comercial, ácido pícrico e ácido acético), e transportada para um laboratório para seu processamento histológico e posterior interpretação microscópica (Blanchard *et al.*, 2003; Love, 2011). Se o processamento da amostra tiver que ser atrasado por uns dias, deve substituir-se a solução de Bouin após 12-24 horas de fixação por uma solução de etanol a 70% ou de formol a 10%, de modo a evitar o endurecimento excessivo da amostra (Love, 2011; Sertich, 2007; Snider *et al.*, 2011).

Após fixação, as amostras são incluídas em parafina, seccionadas e coradas com hematoxilina-eosina (Sertich, 2007). A utilização da coloração tricrómica de Masson pode ser útil quando se pretende detectar fibrose pois, embora a hematoxilina-eosina seja suficiente na detecção da fibrose periglandular focal, as colorações tricrómicas permitem aumentar significativamente o seu reconhecimento e avaliar a severidade da fibrose do estroma (Snider *et al.*, 2011).

A amostra é então analisada por um patologista. É essencial que seja enviada, a acompanhar a amostra, toda a informação detalhada sobre a história pregressa da égua tal como a idade, a data da biópsia, a história reprodutiva, o número de anos de alfeira, a fase do ciclo éstrico na colheita e as características dos órgãos genitais no momento da biópsia, para que se possa realizar uma avaliação correcta (Sertich, 2007; Snider *et al.*, 2011).

As biópsias endometriais são avaliadas segundo vários parâmetros, sendo os principais a fibrose, a inflamação, a presença de agentes infecciosos e a heterogeneidade endometrial (Snider *et al.*, 2011).

Por norma, num endométrio normal, os túbulos das glândulas endometriais não se encontram rodeados por colagénio. No entanto, este pode estar presente quando produzido pelas células do estroma da lâmina própria em resposta a um estímulo. A fibrose pode ser uma sequela inevitável da inflamação se esta for recorrente, ou por uma resposta não inflamatória à dilatação quística das glândulas endometriais. As localizações mais significativas para avaliar a sua presença são as regiões periglandulares e a membrana basal do epitélio luminal, podendo também ser observados ninhos patológicos de matriz extracelular fibrótica nas imediações das zonas periglandulares. Podem também ser observados alguns ninhos de fibrose periglandulares não patológicos durante o anestro (Snider *et al.*, 2011).

Na maioria das éguas saudáveis pode ser observado um reduzido número de leucócitos no endométrio durante o estro (Love, 2011, Snider *et al.*, 2011). No entanto, o seu aumento em número ou a presença de focos de células inflamatórias é compatível com um processo inflamatório crónico. A presença de macrófagos é também indicadora de uma inflamação crónica. Já a presença de eosinófilos é indicativa de uma infecção fúngica ou de condições como a pneumovagina (Snider *et al.*, 2011). As alterações inflamatórias ocorrem mais comumente no estrato compacto, o que sugere que a maioria dos antigénios provém do lúmen uterino. Quando se observa uma inflamação das camadas mais profundas, esta tem normalmente uma origem sistémica (Love, 2011).

Os agentes infecciosos podem ser detectados numa análise histológica, sendo posteriormente analisados com o recurso a colorações especiais como a coloração Gram (bactérias) e a coloração de Gomori (fungos) (Snider *et al.*, 2011).

A avaliação da heterogeneidade endometrial é um objectivo relativamente recente na análise das características uterinas. Esta alteração encontra-se dividida em dois tipos distintos: a heterogeneidade desigual, caracterizada pela presença numa única biópsia de dois padrões fisiológicos diferentes sendo um associado ao ciclo ovárico e o outro completamente divergente; e a heterogeneidade irregular, caracterizada por uma proliferação ou por padrões secretórios anormais afectando todas ou a maioria das glândulas endometriais, não sendo possível atribuir estas alterações a uma diferenciação fisiológica. Snider *et al.* (2011) consideram que os padrões da heterogeneidade desigual se devem a alterações endometriais idiopáticas que afectam a expressão do receptor dos estrogénios e que a heterogeneidade irregular se deve à presença de doenças ováricas, tumores uterinos, tratamentos hormonais ou a causas idiopáticas.

Todas as alterações histológicas observadas numa amostra podem ser classificadas



segundo diversos factores, como o padrão de distribuição da lesão (focal ou difusa); a frequência das alterações (raro, pouco frequente, frequente) e a localização anatómica (estrato compacto, estrato esponjoso, perivascular, periglandular). Podem também ser classificadas quanto à presença de células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos, plasmócitos, macrófagos, eosinófilos); a dimensão da lesão inflamatória (pequena: <120 µm; moderada: 120-300 µm; grande: >300 µm); e ainda quanto à severidade da fibrose periglandular, ou seja, número de camadas de fibrose presentes (ligeira: 1-3 camadas; moderada: 4-10 camadas; severa: >10 camadas) (Sertich, 2007).

Foram desenvolvidos vários esquemas de categorização das biópsias endometriais equinas. Em 1978, Kenney<sup>5</sup> criou a primeira escala, com três categorias (I, II e III), baseada principalmente no grau de inflamação e fibrose (padrão, tipo, extensão e severidade) observados microscopicamente. Nesta escala eram igualmente considerados factores como a fase do ciclo éstrico, e achados macroscópicos, físicos, microbianos e endócrinos detectados pelo clínico antes da interpretação da amostra histológica.

Actualmente, o esquema de categorização utilizado internacionalmente como padrão é o sistema modificado de Kenney-Doig<sup>6</sup>, publicado pela primeira vez em 1986. É baseado no esquema de Kenney de 3 categorias, sendo a segunda categoria subdividida em categoria IIA e IIB (Snider *et al*, 2011). Este novo esquema baseia-se na identificação e quantificação das alterações histológicas do útero segundo o grau de inflamação crónica, fibrose endometrial e atrofia (ou hipoplasia) endometrial e tem como objectivo correlacionar a severidade destes achados com a fertilidade (Love, 2011; Schlafer, 2007).

Assim sendo, as amostras são categorizadas, segundo o seu prognóstico, em categoria I, IIA, IIB e III. Éguas cujas amostras endometriais são classificadas com a categoria I apresentam uma probabilidade de concepção superior a 80% (Blanchard *et al.*, 2003; Snider *et al.*, 2011). Nestas o endométrio exhibe poucas ou nenhuma alteração patológica, não se apresentando hipoplásico ou atrófico (Sertich, 2007). Biópsias de categoria IIA correspondem a uma probabilidade de concepção entre os 50-80% (Blanchard *et al.*, 2003; Snider *et al.*, 2011). Neste caso, o endométrio exhibe alterações inflamatórias ligeiras a moderadas, com infiltração difusa do estrato compacto ou lesões focais frequentes, disseminadas pelos estratos compacto e esponjoso. As alterações fibróticas podem ser raras a frequentes, difusas e envolver ramos glandulares individuais com menos de 3 camadas de fibrose ou com menos de 2 focos de fibrose por 5,5 mm de campo linear numa média de quatro ou mais campos microscópicos. Observa-se a presença de distensão linfática extensa detectada por palpação (Sertich, 2007). Já na categoria IIB a probabilidade

---

<sup>5</sup> Kenney RM. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. J Am Vet Med Assoc 1978;172:241– 62.

<sup>6</sup> Kenney RM, Doig PA. Equine endometrial biopsy, Current therapy in theriogenology 2. Philadelphia: WB Saunders, 1986; p. 723–9.

de concepção está entre os 10-50% (Blanchard *et al.*, 2003; Snider *et al.*, 2011). Corresponde a casos em que o endométrio apresenta características semelhantes às da categoria IIA em éguas que se encontram alfeiras há dois ou mais anos. Apresentam uma inflamação difusa, moderadamente severa e focal. As alterações fibróticas são mais extensas, com mais de 4 camadas de fibrose envolvendo ramos glandulares individuais ou 2 a 4 núcleos de fibrose por 5,5 mm de campo linear, numa média de quatro ou mais campos microscópicos (Sertich, 2007). Amostras classificadas como pertencendo à categoria III correspondem a uma probabilidade de concepção inferior a 10% (Blanchard *et al.*, 2003; Snider *et al.*, 2011).

Estas revelam alterações inflamatórias dispersas, difusas e severas. Incluem não só as alterações que interferem com a capacidade do endométrio de manter uma gestação a termo, mas também aquelas que não são passíveis de ser melhoradas com recurso à terapêutica uterina. Apresentam fibrose periglandular difusa ou mais de 5 núcleos de fibrose por 5,5 mm de campo linear numa média de quatro ou mais campos microscópicos (Sertich, 2007).

Embora, como já referido anteriormente, a biópsia uterina seja o melhor método de diagnóstico para avaliar as características uterinas, há que ter em consideração que existem vários factores que podem ter um impacto negativo no seu valor. Destes importa destacar a fraca qualidade do material enviado ao patologista, a falha na comunicação de toda a informação clínica pertinente, o nível de experiência ou interesse do pessoal envolvido e a falha na análise de achados diagnósticos clinicamente relevantes para o caso (Schlafer, 2007). Para além disso existem muitos artefactos que podem prejudicar a interpretação da biópsia endometrial, sendo os mais comuns a presença de evaginações da face apical das células do epitélio luminal devido ao atraso na imersão da amostra no fixador, a perda de epitélio luminal, a invaginação das glândulas, os artefactos devidos a esmagamento e o excesso de fixação especialmente quando se utiliza a solução de Bouin (Snider *et al.*, 2011).

### **3 MECANISMOS DE DEFESA UTERINA**

Nas éguas, o momento após a cobrição ou inseminação é inevitavelmente marcado por uma inflamação e/ou infecção uterina transitória (Katila, 1996; Troedsson *et al.*, 2001; Troedsson, 1999, 2008; Barbacini, 2003; Watson, 2000; Dell'Aqua Jr *et al.*, 2006).

Em 1962, Bryans acreditava que esta resposta inflamatória uterina aguda após o coito se devia à contaminação bacteriana grosseira que ocorre associada à penetração do pénis do garanhão no tracto reprodutivo feminino. Estudos mais recentes contestam esta teoria demonstrando que esta inflamação transitória é primariamente induzida pela presença de espermatozóides e componentes do plasma seminal e só depois pela presença de bactérias

no lúmen uterino (Katila, 1996; Nash *et al*, 2010).

Deste modo, é bem possível que este fenómeno se trate de uma resposta fisiológica normal à cobertura (Troedsson, 1999).

O útero da égua é mantido livre de contaminantes através de mecanismos físicos, imunológicos e de um sistema linfático funcional.

### **3.1 Barreiras Físicas**

Na égua normal, o útero é protegido de contaminações externas por diversas barreiras físicas como a vulva, o vestíbulo, a vagina, o hímen e o cérvix (Lu e Morresey, 2006; Troedsson 1999). Qualquer comprometimento destas barreiras expõe o útero a agentes irritantes e contaminantes, favorecendo o estabelecimento de infecções e predispondo a égua à ocorrência de infecções uterinas crónicas (Troedsson, 1999; Fiala, 2004).

Na espécie equina, independentemente do método de cobertura, o sémen é depositado directamente no lúmen uterino. Portanto, nesse momento as barreiras físicas são ultrapassadas, sendo os espermatozóides, as proteínas do plasma seminal e as bactérias do sémen e da superfície do pénis do garanhão, responsáveis pela indução de uma resposta inflamatória aguda.

O relaxamento do cérvix durante o estro é um fenómeno essencial para que haja o movimento dos espermatozóides para dentro e para fora do útero. Se esta estrutura não abrir adequadamente, a eliminação dos espermatozóides e sub-produtos da inflamação encontra-se comprometida.

O endométrio da égua, à semelhança do tracto respiratório, apresenta uma mucosa parcialmente ciliada que é constantemente confrontada com infecções exógenas e desafios inflamatórios. Alterações patológicas do endométrio resultam, inevitavelmente, em alterações estruturais da superfície epitelial como a perda de células ciliadas e da integridade da barreira da mucosa (Lu e Morresey, 2006).

O muco tem um papel muito importante na defesa do tracto reprodutivo feminino. O muco cervical tem como função manter o ambiente uterino estéril e defender o útero contra microrganismos invasores, agindo simultaneamente como barreira física e microfiltro. Contém também imunoglobulinas, particularmente IgA, e proteínas com actividade antimicrobiana (Lu e Morresey, 2006).

Num estudo em Medicina Humana sobre o muco cervical, verificou-se que os efeitos antimicrobianos do muco aumentavam significativamente com a estimulação sexual. Embora o mecanismo exacto seja desconhecido, este aumento pode ser atribuído à estimulação directa das células endometriais pelos espermatozóides, à interacção com proteínas seminais ou às proteínas antimicrobianas presentes no plasma seminal (Lu e Morresey,

2006). São exemplos de proteínas encontradas no muco cervical proteínas como a lisozima, a protease inibidora da secreção de leucócitos, a defensina e a lactoferrina. A lisozima actua em sinergia com a Ig A na indução da bacteriólise (Lu e Morresey, 2006).

Éguas com aderências ou lacerações cervicais, com conformação vulvar anormal (e.g. com índice de Caslick superior a 50), com massas/ pólipos vaginais, com lacerações perineais, com fístulas recto-vestibulares ou com rupturas vaginais, entre outros, encontram-se muito mais predispostas a adquirirem infecções uterinas persistentes.

### **3.2 Limpeza mecânica**

Para além das barreiras anatómicas, o tracto genital feminino apresenta mecanismos para resistir a infecções e eliminar microrganismos.

Um importante mecanismo para a eliminação rápida dos agentes agressores e dos componentes e subprodutos inflamatórios é a contractibilidade miometrial. No entanto, o desempenho deste mecanismo requer um bom relaxamento e uma abertura adequada do cérvix.

As contracções uterinas são essenciais para que ocorra uma limpeza física uterina eficiente através do cérvix e drenagem linfática. A sua função é remover todas as bactérias e produtos inflamatórios prejudiciais, libertados durante a fagocitose levada a cabo pelos PMNs, e durante a morte programada destas mesmas células. A sua incompetência apresenta, portanto, uma enorme importância na persistência de infecções e fluido intra-uterino (Troedsson, 1999; Lu e Morresey, 2006).

Durante o estro ocorrem períodos de actividade contráctil de aproximadamente 5 minutos alternados com períodos equivalentes de repouso. Em resposta à agressão, ocorre um aumento rápido da intensidade destas contracções (Malschitzky *et al*, 2007).

Knudsen, em 1964, descobriu que éguas multíparas mais velhas, com dilatação parcial do útero, acumulavam líquido intra-uterino após cobertura. Cinco anos mais tarde (1969), Hughes e Loy verificaram que em éguas novas em diestro ocorria um relaxamento do cérvix até 12 horas após indução de uma infecção uterina, que tal relaxamento estava associado a uma descarga vaginal e que, quatro dias após a inoculação bacteriana, o tônus cervical havia voltado ao normal. Tal estudo permitiu-lhes concluir que a descarga mecânica através de um cérvix relaxado poderia ser um factor importante na capacidade do útero eliminar a infecção bacteriana (Troedsson, 1999). Pode-se afirmar que a limpeza física do útero é mais eficiente durante o estro uma vez que este representa o momento do ciclo éstrico em que o cérvix se encontra relaxado.

Após a ovulação e o encerramento do cérvix, o sistema linfático torna-se responsável pela drenagem dos subprodutos do processo inflamatório. Entretanto, para que a drenagem

linfática exerça sua função, é fundamental uma boa contratibilidade miometrial (Malschitzky *et al*, 2007).

Mesmo quando a contractibilidade está prejudicada, os demais mecanismos de defesa da égua são capazes de eliminar a infecção bacteriana.

A presença, distribuição e retenção de fluido intra-uterino depende de múltiplos factores, como a má conformação perineal, a fibrose do cérvix, um maior número de gestações e a idade. Estes factores causam alterações no útero que prejudicam a contractibilidade uterina, a drenagem linfática e, conseqüentemente, a limpeza uterina (Nikolakopoulos e Watson, 1999).

A posição relativa do útero também pode interferir na eficiência da sua limpeza mecânica. Éguas mais velhas e multíparas possuem um útero mais flácido e relaxado que se estende para além do bordo pélvico e, portanto, elimina o fluido intra-uterino muito mais lentamente que no caso de éguas novas e primíparas (Nikolakopoulos e Watson, 1999).

Foram também descritas alterações vasculares degenerativas na parede uterina de éguas velhas, não sendo claro até que ponto essas alterações afectam o aporte sanguíneo do miométrio e a sua função contráctil (Troedsson, 1999).

Actualmente crê-se que a susceptibilidade de algumas éguas para adquirir endometrite persistente se deva, em grande parte, ao colapso dos mecanismos de limpeza física do útero (Troedsson, 1999).

Nikolakopoulos e Watson (1999) demonstraram pela primeira vez que a inibição da actividade miometrial em éguas com o tracto reprodutivo normal resulta na presença de fluido intra-uterino 48 horas após a inoculação bacteriana, convertendo éguas resistentes em éguas susceptíveis.

Éguas com susceptibilidade aumentada para a endometrite pós-coital persistente, no seguimento de uma inflamação/ infecção uterina aguda, apresentam uma actividade eléctrica miometrial diminuída, uma possível disfunção linfática e menor motilidade uterina do que éguas reprodutivamente normais. Isto resulta na acumulação de fluido e de produtos inflamatórios no lúmen uterino (Troedsson, 1999; Nikolakopoulos e Watson, 1999). Actualmente ainda se desconhece qual a origem destas alterações (Troedsson, 1999).

Têm sido utilizados diversos métodos para estudar a contractibilidade uterina nas éguas, como os transdutores de pressão intra-uterinos, a electromiografia, a ecografia transrectal e a cintigrafia (Katila, 1999).

Com o auxílio da electromiografia é possível registar a actividade miometrial e, assim, concluir que a reduzida capacidade de limpeza uterina observada em éguas susceptíveis se deve a uma redução da actividade miometrial na resposta à inflamação (Troedsson, 1999).

Éguas velhas susceptíveis de desenvolver endometrites apresentam menor tónus muscular activo do que éguas normais em resposta a agonistas do tónus muscular, o que sugere a

existência de um defeito miometrial uterino intrínseco. Esta fraca resposta não aparenta ser mediada por receptores da ocitocina ou da prostaglandina  $F_2\alpha$ . Foi observada tanto nas éguas susceptíveis como nas éguas reprodutivamente normais uma distribuição semelhante dos íons de cálcio o que sugere que estas alterações ocorrem nos mecanismos das células musculares que envolvem os canais de cálcio e a regulação deste catião. Outras explicações para a debilidade dos mecanismos de limpeza uterina em éguas velhas e susceptíveis incluem a diminuição da produção de prostaglandina  $F_2\alpha$  em resposta à estimulação da ocitocina e também a existência de uma possível lesão neurológica e/ou estrutural do colagénio e elastina secundária à tensão mecânica sofrida pelo útero múltiparo (Lu e Morresey, 2006).

São ainda necessários mais estudos para determinar se a disfunção miometrial se deve a uma redução do aporte sanguíneo do miométrio, a uma disfunção contráctil devido a alterações endócrinas ou moleculares, a uma diminuição da drenagem linfática ou se se deve simplesmente ao facto de as éguas mais velhas sofrerem inevitavelmente, devido às múltiplas gestações, um desvio crânio-ventral do tracto reprodutivo (Troedsson, 1999).

### **3.3 Mecanismos humorais**

À semelhança dos tractos respiratório e digestivo, o útero possui características de um tecido linfóide associado à mucosa. No entanto, este órgão encontra-se sujeito a mudanças cíclicas que afectam sobretudo o endométrio e a população de leucócitos do endométrio e lúmen uterino (Schuberth *et al.*, 2008).

O contacto do sémen e seus constituintes com o útero e cérvix induz uma série de reacções e mecanismos tanto celulares como humorais.

As imunoglobulinas foram detectadas pela primeira vez em líquidos de lavagem uterina por Kenney e Khaleel em 1975, tendo sido na altura isoladas seis classes: IgG<sub>a</sub>, IgG<sub>b</sub>, IgG<sub>c</sub>, IgT, IgA e IgM (Katila, 1996; Troedsson, 1999).

A suspeita inicial de que éguas problemáticas, susceptíveis a endometrite pós-coital, possuíam uma deficiência em IgA levou a que fossem administradas infusões intra-uterinas de colostro no seu tratamento (Katila, 1996). O colostro é utilizado como fonte de imunoglobulinas. No entanto, Asbury *et al.* (1980) relatou que éguas incapazes de eliminar bactérias após a sua inoculação intra-uterina apresentavam, de facto, concentrações mais elevadas de anticorpos nas suas secreções uterinas que as éguas resistentes à endometrite (Katila, 1996).

Widders *et al.* (1984, 1985) mostraram que a transudação passiva de imunoglobulinas para o lúmen uterino é mínima e que a IgG e a IgA são produzidas localmente pelo tracto genital (Troedsson, 1999).

Estudos imunohistoquímicos do endométrio sugerem que as concentrações de imunoglobulinas livres e o número de células que as contêm mantêm-se num nível constante durante todo o ciclo éstrico (Troedsson, 1999).

Éguas com endometrite pós-coital persistente apresentam um maior número de células contendo imunoglobulinas quando comparado com éguas reprodutivamente normais (Troedsson, 1999).

Embora as imunoglobulinas e, portanto, a defesa uterina mediada por anticorpos sejam um componente essencial na eliminação eficaz de contaminação bacteriana, a susceptibilidade apresentada por algumas éguas para adquirirem infecções uterinas não parece ser resultado de uma deficiência nestes elementos (Katila, 1996). As éguas susceptíveis apresentam valores de imunoglobulinas similares ou mesmo superiores às éguas resistentes à endometrite o que sugere que a defesa imunológica se encontra plenamente funcional nas éguas susceptíveis e que a persistência da endometrite se deve, portanto, a outros factores (Troedsson, 1999).

De acordo com Katila (1996) não existe nenhuma conclusão evidente de que as imunoglobulinas, opsoninas (complemento, IgG e outros), a migração de número suficiente de neutrófilos em resposta ao estímulo quimiotático e a fagocitose são deficientes nas éguas susceptíveis à endometrite, sendo a susceptibilidade de algumas éguas melhor explicada pelos factores envolvidos na limpeza uterina: dilatação cervical, contractibilidade do miométrio e drenagem linfática.

### **3.4 Mecanismos celulares e mediadores pró e anti-inflamatórios**

As defesas uterinas na égua não parecem depender unicamente de factores humorais.

O contacto dos componentes do ejaculado com as células uterinas e cervicais despoleta também uma resposta inflamatória uterina pós-coital cujo evento principal corresponde à síntese e libertação de mediadores quimiotáticos que resulta na afluência de polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) para o lúmen uterino em resposta ao antigénio (Troedsson, 1999; 2001; Schuberth *et al.*, 2008). Servem de agentes quimiotáticos para os PMNs no útero não só os produtos do complemento como o leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), a prostaglandina E (PGE), a PGF<sub>2</sub>α (Troedsson, 1999; 2001) e também citocinas, quimiocinas e outros mediadores que, em conjunto, orquestram uma resposta celular (Schuberth *et al.*, 2008). Os principais factores pró-inflamatórios estimulam também a infiltração dos tecidos uterinos e cervicais pelos macrófagos, células dendríticas e granulócitos (Schuberth *et al.*, 2008).

Uma vez iniciado o processo inflamatório, uma série de mediadores pró-inflamatórios é libertada pelos neutrófilos em fagocitose, pelas células do endotélio vascular, por células

endometriais lesadas e pelos macrófagos activados pela inflamação. As principais funções desses mediadores são atrair mais células de defesa para o local da inflamação, facilitar o acesso dessas células e melhorar a eficiência da eliminação do agente agressor.

Segundo Katila (1996), não existe nenhuma diferença na migração dos PMN's entre éguas resistentes e susceptíveis. Existem, no entanto, estudos contraditórios que referem a possibilidade de a função dos PMNs de éguas susceptíveis estar tanto diminuída como aumentada quando comparada com éguas resistentes. Tal conflito pode dever-se ao facto de serem utilizados diferentes protocolos experimentais e éguas em diferentes fases do ciclo éstrico. Troedsson (1993), num estudo sobre o efeito dos factores uterinos locais na função dos PMNs, sugere que o decréscimo da fagocitose observada em PMNs de éguas susceptíveis resulta de uma opsonização insuficiente na secreção uterina presente e não de uma disfunção primária dos PMNs pois PMNs de éguas susceptíveis, quando lhes era proporcionado um ambiente uterino adequado, encontravam-se perfeitamente funcionais mas quando era utilizada uma secreção uterina de égua susceptível como fonte de opsoninas, os mesmos PMNs apresentavam-se disfuncionais (Troedsson, 1999).

Embora as éguas susceptíveis tenham concentrações mais elevadas de anticorpos nas suas secreções uterinas que as éguas resistentes, têm também uma capacidade de limpeza mecânica diminuída e, como tal, acumulam-se enzimas inflamatórias no útero que podem destruir mediadores inflamatórios benéficos resultando, possivelmente, numa opsonização insuficiente de antigénios que, assim, escapam à fagocitose pelos PMNs (Troedsson, 1999). Esta acumulação de enzimas leva a uma degradação enzimática dos tecidos que pode ser responsável por alterações fibróticas degenerativas no endométrio (Troedsson, 1999).

Os neutrófilos são células fagocitárias sendo, portanto, importantes para a limpeza do ambiente uterino, não só da contaminação accidental por microrganismos após inseminação como para eliminar os espermatozóides remanescentes, na presença de opsoninas (Schuberth *et al.*, 2008; Troedsson, 1999). Considera-se, sem no entanto existirem provas, que os espermatozóides velhos, mortos ou capacitados são o alvo preferencial, sugerindo-se que os neutrófilos têm um papel activo na selecção dos espermatozóides removendo aqueles que são supérfluos, imóveis ou que se encontram danificados (Schuberth *et al.*, 2008).

A cascata do complemento medeia uma série de reacções biológicas, todas elas com o intuito de defender o organismo contra um agente estranho. Estas reacções incluem o aumento de permeabilidade vascular, a quimiotaxia, a opsonização antes da fagocitose, a activação das lipases membranárias e a lise dos organismos-alvo (Troedsson *et al.*, 2001; Troedsson, 1999). Um estudo *in vitro* demonstrou que o espermatozóide equino activa o complemento presente na secreção uterina, ocorrendo a clivagem do factor C5 em C5a e C5b. Este fenómeno resulta na quimiotaxia mediada pelo factor de complemento C5a e



consequente migração de PMNs ao lúmen uterino (Troedsson *et al.*, 2001; Troedsson, 2006). Já o factor de complemento C3b opsoniza bactérias e espermatozóides facilitando a fagocitose e remoção desses produtos do tracto reprodutivo (Troedsson *et al.*, 2001).

As respostas imunitárias agudas do útero das éguas são também moduladas por citocinas como o factor de estimulação de colónias granulócito-macrófago (GM-CSF), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6), factor de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) (Fumuso *et al.*, 2006; Palm *et al.*, 2008; Schubert *et al.*, 2008).

A IL-6 é produzida por mastócitos e macrófagos em resposta à presença de endotoxinas bacterianas e aparenta ter um efeito protector no endométrio de éguas jovens durante o estro após um evento pró-inflamatório (e.g. IA). Esta citocina promove a diferenciação das células B, das células T e estimula a produção de proteínas de fase aguda (Lewis, 2004, Prescott *et al.*, 2005). Estudos recentes sugerem que a IL-6 é também responsável pela regulação da transição de uma fase de dominância dos neutrófilos para uma fase dominada pelos macrófagos (Liepina *et al.*, 2010). Por outro lado a interleucina 12 (IL-12) é responsável pela indução da produção de interferon- $\gamma$  e estimula a citotoxicidade das células Natural Killer (Lewis, 2004).

Por sua vez, a interleucina 8 (IL-8), uma potente quimiocina, possui um papel igualmente essencial na quimiotaxia dos PMNs porque promove a sua migração para o lúmen uterino, a desgranulação das células fagocitárias com consequente libertação de várias enzimas que ajudam a completar a digestão celular e porque estimula a libertação de intermediários reactivos do oxigénio (ROIs), como o superóxido, o peróxido de hidrogénio e o radical hidroxilo (Liepina *et al.*, 2010, Lewis, 2004; Prescott *et al.*, 2005). Estes subprodutos são extremamente tóxicos e eficazes na invasão e morte dos microrganismos e são produzidos por enzimas lisossomais dependentes de oxigénio como consequência do aumento do consumo do oxigénio para produção de ATP necessário para a fagocitose (Prescott *et al.*, 2005).

Outro potente mediador da resposta inflamatória e citotóxica é o TNF $\alpha$ . É responsável por uma grande variedade de efeitos devido à sua capacidade de mediar a expressão de genes de factores de crescimento e de citocinas e a expressão de factores, receptores, mediadores inflamatórios e proteínas de fase aguda. Para além disso possui um papel importante no desenvolvimento de resistências a infecções servindo como estimulador imunitário e mediador da resposta inflamatória (Prescott *et al.*, 2005). Esta citocina estimula também a produção endometrial de PGF2 $\alpha$  (Lewis, 2004). A expressão aumentada do RNAm do TNF $\alpha$  tem sido recentemente revelada como sendo um elemento muito importante na patogénese da endometrite pós-coital (Palm *et al.*, 2008; Liepina *et al.*, 2010).

Os lisossomas dos neutrófilos contém uma série de enzimas lisossomais, incluindo as peroxidases e enzimas hidrolíticas como a lisozima, a fosfolipase A, a ribonuclease, a

desoxirribonuclease, proteases e as enzimas dependentes do oxigénio anteriormente referidas (Prescott *et al.*, 2005), cuja actividade foi demonstrada no endométrio da égua (Tizard, 1998). Estes organelos possuem também proteinases neutras, como as collagenases, as elastases e as gelatinases que favorecem o aporte celular e iniciam imediatamente o processo de reparação do endométrio (Mackay, 2000). A plasmina é uma enzima fibrinolítica que ao exercer sua função liberta fragmentos peptídicos que são quimiotáticos para os neutrófilos (Tizard, 1998). Como são potentes opsoninas para os neutrófilos, são encontradas em altas concentrações em locais de inflamação aguda (Tizard, 1998).

Recentemente foi também demonstrado que os neutrófilos produzem intermediários reactivos do azoto (RNIs). Estas moléculas incluem o óxido nítrico (NO) e as suas formas oxidadas, nitrato e nitrito. O NO é provavelmente o RNI mais eficaz sendo responsável pela lise de bactérias no interior do neutrófilo (Mackay, 2000; Prescott *et al.*, 2005).

Também os eicosanóides, como a  $\text{PGF}_2\alpha$  e o  $\text{LTB}_4$ , são conhecidos pelos seus efeitos benéficos para a saúde uterina. Já a  $\text{PGE}_2$  é responsável por um efeito inibidor da função imunitária uterina, particularmente da função dos PMNs. A  $\text{PGF}_2\alpha$ , para além de induzir alterações na permeabilidade vascular e estimular a contractibilidade uterina, induz a luteólise. Este fenómeno resulta numa redução da concentração de progesterona circulante, reduzindo o seu efeito imunossupressor sobre as defesas imunitárias uterinas (Lewis, 2004). Estudos *in vitro* desenvolvidos por Hoedemaker *et al.* (1992) demonstram ainda que a  $\text{PGF}_2\alpha$  estimula a quimiotaxia e a fagocitose pelos PMN's e que o  $\text{LTB}_4$  estimula a quimiotaxia, migração e a citotoxicidade mediada por células independente dos anticorpos. Um estudo realizado em bovinos indica que o  $\text{LTB}_4$  promove ainda a involução uterina e reduz o risco de infecção uterina. O aumento da  $\text{PGF}_2\alpha$  uterina é provavelmente também responsável pelo aumento da actividade da fosfolipase  $\text{A}_2$  uterina ( $\text{PLA}_2$ ) e da ciclo-oxigenase 2 ( $\text{COX-2}$ ), que por sua vez produzem ácido araquidónico livre e o convertem em  $\text{PGF}_2\alpha$  ou noutros produtos (e.g.  $\text{LTB}_4$ ) (Lewis, 2004).

Como a inflamação aguda pode causar danos aos tecidos, deve ser mantida tanto quanto possível sob controlo. O mesmo estímulo que induz a libertação dos mediadores pró-inflamatórios promove o aparecimento de mecanismos e de moléculas que actuam terminando o processo inflamatório assim que ele deixe de ser necessário. Essas moléculas actuam inibindo a produção das citocinas pró-inflamatórias, bloqueando os receptores celulares ou induzindo a morte celular. A interleucina 10 (IL-10) apresenta um potente efeito anti-inflamatório através da inibição da produção das citocinas pró-inflamatórias do endométrio (Fumuso *et al.*, 2006). As células produzem um subtipo de Interleucina 1 (IL-1) que não age como citocina, mas que bloqueia os receptores para a IL-1 $\beta$  impedindo os seus efeitos. A IL-6, que logo após a agressão é uma citocina pró-inflamatória, pode num estadio

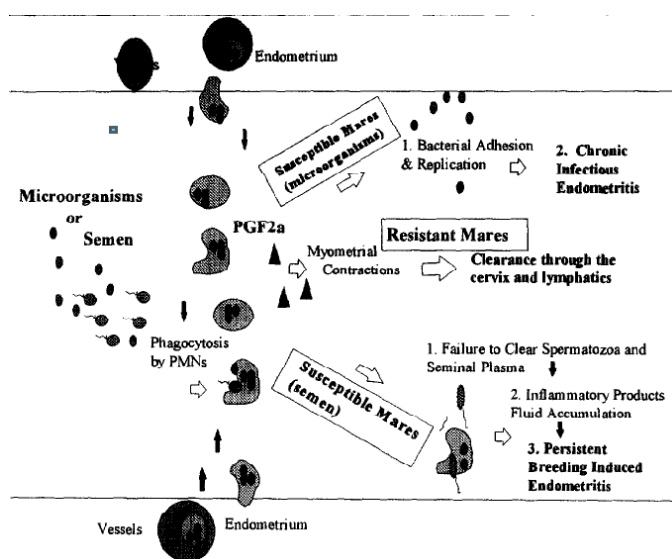
mais avançado induzir a apoptose dos neutrófilos eliminando os subprodutos inflamatórios sem o risco de que sejam libertados no próprio tecido (Mackay, 2000). A progesterona suprime a produção da IL-8, IL-6 e da IL-12 (Lewis, 2004).

#### 4 RESPOSTA INFLAMATÓRIA PÓS-COBERTURA OU PÓS-INSEMINAÇÃO

A endometrite pós-coital aguda transitória é um fenómeno normal que ocorre fisiologicamente após a cobertura natural ou a inseminação artificial. Tem como finalidade remover o excesso de espermatozóides, plasma seminal, diluidores ou contaminantes antes da entrada do embrião no útero (Troedsson, 1999, 2006, 2008; Troedsson *et al*, 2001; Fiala *et al*, 2007; Dell'Aqua Jr *et al*, 2006; Card, 2005; Palm *et al*, 2006; Alghamdi *et al*, 2004). Esta reacção pode ocorrer mesmo após a inoculação de espermatozóides estéreis no lúmen uterino (Troedsson, 1999).

Tendo por base o conhecimento actual, é sugerido que a presença de espermatozóides ou contaminantes bacterianos despoleta uma invasão maciça de PMNs do sangue para o lúmen uterino através da activação do complemento. Estes PMNs fagocitam as bactérias e os espermatozóides. Esta inflamação resulta na libertação de  $\text{PGF}_2\alpha$ , pelo metabolismo do ácido araquidónico através da via da ciclo-oxigenase, que, por sua vez, desencadeia contracções miométriais, essenciais para o transporte dos espermatozóides e para a limpeza uterina via cérvix ou via linfática (Troedsson *et al*, 2001; Troedsson, 2006, 2008) (Figura 17).

Figura 17 – Representação esquemática dos mecanismos de defesa uterina em éguas (Adaptado de Troedsson, 1999)



A migração dos PMNs para o lúmen uterino ocorre entre a 1 e as 12 horas após cobertura ou IA (Schuberth *et al*, 2008) sendo que, em éguas normais, os primeiros neutrófilos invadem o

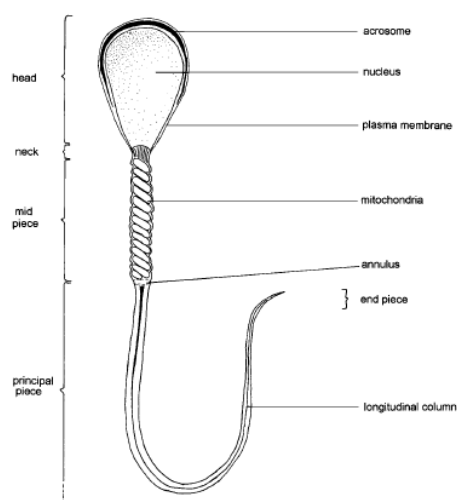
útero 30 minutos após IA ou infecção experimental (Katila, 1996, 2001; Troedsson *et al.*, 2001, Troedsson, 2008; Fiala *et al.*, 2007; Güvenc *et al.*, 2005) e o seu pico dá-se entre as 6 e as 12 horas após IA (Katila, 1996). O número máximo de neutrófilos não difere entre éguas resistentes e susceptíveis, no entanto, em éguas com infecção persistente os PMNs permanecem em número elevado por períodos de tempo mais longos, ao contrário do que acontece nas éguas saudáveis em que o número de neutrófilos diminui gradualmente, tendo estes desaparecido completamente às 48 horas após IA (Katila, 1996). Katila (1995), relata a presença de um elevado número de leucócitos no lúmen uterino de éguas mesmo às 48 horas após IA. Éguas ditas normais, ou seja, cujos mecanismos de defesa uterina se encontram plenamente competentes, eliminam bactérias e os sub-produtos inflamatórios rapidamente, entre as 24 e as 36 horas após contaminação (Troedsson, 1999). A endometrite pós-coital corresponde ao precursor da endometrite pós-coital persistente, que é considerada pelos profissionais médico-veterinários a causa mais comum de infertilidade em éguas (Nash *et al.*, 2010; Troedsson, 1999).

#### 4.1 Papel dos espermatozóides

O espermatozóide, gâmeta masculino, é o produto final do processo de espermatogénese e a sua função capital consiste em transportar e libertar o conteúdo genético (contido no seu núcleo) no citoplasma do óvulo, onde ocorre a combinação dos pró-núcleos haplóides masculino e feminino de modo a produzir um zigoto e iniciar o desenvolvimento de um novo ser (Eddy, 2006).

É uma célula altamente especializada, constituída por uma cabeça, colo e cauda, possuindo uma dimensão de aproximadamente 60µm (Figura 18) (Brito, 2007).

Figura 18 – Representação esquemática de um espermatozóide de garanhão (Morel, 1999)



A cauda é a parte mais longa do espermatozóide e é constituída pela peça intermediária, peça principal e peça final (Brito, 2007, Eddy, 2006). O bordo posterior da cabeça do espermatozóide e a peça intermediária encontram-se unidos na região do colo, que por si só é uma estrutura altamente especializada (Meyers, 2009). A cabeça do espermatozóide de garanhão apresenta uma forma oval alongada, com terço anterior mais largo, e relativamente achatada. Esta estrutura contém um núcleo (que encerra a cromatina muito condensada), o acrossoma (vesícula preenchida por enzimas, cujo conteúdo é libertado quando o espermatozóide se aproxima ou atinge a superfície do óvulo de modo a facilitar a fertilização), o citoesqueleto e uma pequena quantidade de citoplasma (Eddy, 2006). O flagelo/ cauda é a fracção que faculta ao espermatozóide a capacidade para se movimentar num meio líquido, porque contém a fonte de energia e os mecanismos necessários para gerar a mobilidade que permite ao espermatozóide mover-se até ao óvulo.

O útero tem um duplo papel na interacção com os espermatozoides. Por um lado, as contracções uterinas transportam-nos até ao oviducto, por outro lado, eliminam os espermatozoides em excesso (Katila, 2001).

Tanto os espermatozoides como os agentes bacterianos podem induzir uma reacção inflamatória no útero. Esta resposta é caracterizada pelo rápido influxo de PMNs para o lúmen e parede uterina em resposta à libertação de mediadores quimiotáticos devido à presença de um antigénio.

Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que quando os espermatozoides entram no útero activam o complemento presente nas secreções uterinas (Troedsson, 2006; Fiala *et al* 2007). Tanto os produtos do complemento como o leucotrieno B<sub>4</sub>, prostaglandina E<sub>2</sub> e a prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  servem de agentes quimiotáticos dos PMNs no útero (Troedsson *et al*, 2001).

O papel quimiotático dos espermatozoides através da activação do complemento sugere fortemente que a inflamação uterina transitória após cobrição é fisiológica e essencial para a limpeza uterina do excesso de espermatozoides e plasma seminal (Troedsson *et al*, 2001).

Numa inseminação artificial com sémen fresco, a maioria dos espermatozoides é eliminada 4 horas após inseminação, sobrando muito poucos decorridas 48 horas (Katila, 2001).

Espermatozoides mortos, danificados ou imóveis são removidos do útero por fagocitose, provavelmente por marcação para destruição através do revestimento da sua cabeça com IgG (Katila, 2001).

Os espermatozoides ligam-se aos PMNs activados exclusivamente pela cabeça (Alghamdi *et al*, 2004). Não se compreende ainda completamente a natureza desta ligação, mas julga-se que possa ser mediada por opsonização na presença do factor do complemento C3b ou de anticorpos, ou por uma ligação específica entre um receptor e um ligando (Alghamdi *et al*, 2004; Troedsson, 2006, 2008). Estudos recentes sugerem que esta ligação pode também ser mediada pela extrusão de DNA dos PMNs em forma de redes extracelulares (NETs) que

aprisionam os espermatozóides, adicionalmente à ligação tradicional receptor-ligando (Troedsson, 2006, 2008).

Estas NETs podem ser convenientemente visualizadas por microscopia de fluorescência ou microscopia electrónica de varredura, e ser apreciadas ao microscópio óptico através da presença de aglomerados de espermatozóides em volta de um ou mais neutrófilos e de espermatozóides com vigor mas sem motilidade progressiva (Alghamdi *et al*, 2009).

Durante a activação dos PMNs é libertada  $\text{PGF}_2\alpha$  da sua membrana celular através da via das cicloxigenases (Troedsson, 2006). Além de mediador inflamatório é responsável pelas contracções do músculo liso uterino que se acredita serem responsáveis pela eliminação física do fluido inflamatório acumulado no lúmen após cobertura (Troedsson, 2006, 2008).

A ligação entre os espermatozóides e PMNs resulta na formação de grandes agregados celulares que podem interferir com o transporte dos espermatozóides para o oviducto, diminuindo a sua mobilidade. A redução da mobilidade dos espermatozóides incubados em secreções uterinas contendo PMNs pode sugerir que poucos ou nenhuns espermatozóides atingem o oviducto na presença destas células inflamatórias. No entanto, alguns espermatozóides aparentam ser resistentes à ligação aos PMNs, o que sugere provavelmente a existência de populações heterogéneas de espermatozóides (Alghamdi *et al*, 2004).

Está também comprovado que os espermatozóides mortos não induzem uma maior inflamação que os espermatozóides vivos. No entanto, não se conhece ainda exactamente qual o processo de selecção dos espermatozóides pelos PMNs. Contudo, apenas uma pequena minoria escapa à fagocitose, sendo a grande maioria dos espermatozóides eliminada até 5 horas após a inseminação (Katila, 2001, 2005).

As interacções entre os espermatozóides e o endométrio podem ser moduladas através da modificação do tipo de inseminado, concentração, número, viabilidade e motilidade dos espermatozóides, volume do ejaculado e ausência ou presença do plasma seminal (Katila, 2001).

A imunidade da mucosa uterina pode também ser caracterizada por alterações a nível molecular, nomeadamente na expressão de RNAm de genes relevantes para a inflamação. Após IA com espermatozóides mortos, a expressão endometrial de RNAm de genes de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  e IL-8) aumenta e a da IL-10 anti-inflamatória diminui. Nash *et al* (2010) realizaram o primeiro estudo com espermatozóides vivos, e, ao contrário do anteriormente postulado para espermatozóides mortos, não observaram qualquer alteração na expressão do RNAm da IL-8 no endométrio antes ou após a inseminação.

## 4.2 Papel da concentração, volume e tipo de sémen

A concentração espermática e o volume do inseminado têm um papel importante na intensidade da reacção inflamatória uterina (Fiala *et al*, 2007). No entanto, o volume, por si só, não afecta a magnitude da resposta inflamatória uterina (Güvenc *et al*, 2005).

Na égua, a utilização de um pequeno volume de sémen concentrado na inseminação intrauterina resulta numa resposta inflamatória mais exuberante que quando são utilizados grandes volumes de inseminado menos concentrado. Ou seja, maiores concentrações espermáticas constituem um maior estímulo quimiotático que concentrações mais baixas (Watson *et al*, 2001; Fiala *et al*, 2007). Numa inseminação artificial com volumes maiores, cujo sémen é mais diluído, grande parte do fluido e espermatozóides são eliminados pela vagina pouco tempo após inseminação, enquanto que quando são utilizados volumes mais pequenos é mais provável que os espermatozóides estejam em contacto directo com o endométrio durante um maior período de tempo, levando a um influxo superior de PMNs para o lúmen uterino (Watson *et al*, 2001).

As contracções uterinas são responsáveis não só pelo transporte dos espermatozóides para o local de fertilização como pela eliminação dos espermatozóides e plasma seminal em excesso, dos contaminantes, bem como de todos os produtos inflamatórios.

Katila observou que não existe qualquer diferença entre o número de contracções uterinas e a distribuição ou eliminação dos espermatozóides em éguas inseminadas com ejaculados de diferentes volumes (Katila, 2001). Contraditoriamente, outros autores sugerem que o volume médio de um ejaculado (80 mL) aumenta a frequência, duração e amplitude das contracções uterinas. Num estudo mais recente, Campbell e England (2006) confirmaram que infusões intrauterinas de 80 mL de soro salino fisiológico aumentam as contracções uterinas e revelaram, pela primeira vez, que a infusão tanto de pequenos (10 mL) como grandes volumes (150 mL) reduz estas contracções. Esta diferença pode dever-se, respectivamente, à carência de estimulação dos receptores de tensão uterinos e à distensão excessiva que leva a uma refractariedade dos mesmos receptores. As contracções uterinas podem também ser promovidas pela acção local de hormonas presentes no ejaculado do garanhão, como as prostaglandinas, estrogénios e oxitocina. Logo, o facto de ejaculados de pequeno volume não originarem ou reduzirem as contracções uterinas pode ser simplesmente um reflexo da menor quantidade destas hormonas, quando comparado com os ejaculados de volumes médios.

O sémen pode ser usado de 4 modos: fresco não diluído, sendo usado imediatamente em uma ou duas éguas dependendo do volume do ejaculado, diluído e usado em fresco imediatamente após a sua recolha, diluído e refrigerado de modo a ser utilizado num período não superior a 72h, ou diluído e congelado quando se pretende um armazenamento mais prolongado e utilizar esse sémen no futuro.



O sémen congelado aparenta provocar uma maior resposta inflamatória devido à maior concentração de espermatozóides e/ou ao reduzido volume de plasma seminal ou do volume do inseminado (Katila, 2001). Outros factores que contribuem para este facto são o atraso na limpeza uterina em éguas susceptíveis à endometrite e/ou uma reacção de hipersensibilidade aos componentes dos diluidores de congelação, nomeadamente o glicerol e a gema de ovo (Card, 2005). Troedsson (1998) verificou que 30% das éguas inseminadas com sémen congelado apresentavam acumulação persistente de fluido intrauterino após IA, contrastando com os 16% observados com monta natural (Barbacini *et al*, 2003). Contudo, Watson *et al* (2001) relatam que a incidência da acumulação de fluido intrauterino no dia após inseminação artificial com sémen congelado é semelhante à observada após monta natural (16%), o que contraria as conclusões anteriormente relatadas. Esta maior inflamação uterina não é comum quando se inseminam éguas novas, primíparas e reprodutivamente normais com sémen congelado (Card, 2005).

Foi também demonstrado que, para iguais números de espermatozóides, ocorre uma maior reacção inflamatória em inseminados menos volumosos e, portanto, sémen de elevada concentração, como o sémen congelado, induz uma reacção inflamatória mais exuberante (Katila, 2001, 2005; Güvenc *et al*, 2005). No entanto, resultados contraditórios foram revelados por Nikolakopoulos e Watson (2000) que detectaram uma maior reacção inflamatória após infusão de ejaculados menos concentrados, decorridas 48 horas após inseminação. Tal discrepância pode ser devida à utilização de diferentes protocolos e tempos de recolha de amostras. De facto, como o pico da resposta inflamatória uterina ocorre por volta das 6 a 12 horas após inseminação, é possível que este maior estímulo quimiotático desenvolvido pelo sémen com maior concentração de espermatozóides seja responsável por uma maior e mais rápida resposta neutrofílica que elimina com maior eficiência os espermatozóides e bactérias, logo, a inflamação tem uma duração tão reduzida que às 48 horas apenas são detectados vestígios da inflamação inicialmente formada (Katila, 2001, 2005; Fiala *et al*, 2007). Estímulos mais ligeiros (i.e. ejaculados menos concentrados) provocam uma resposta inflamatória menos intensa, mais tardia e duradoura, aumentando o número de PMNs detectados mais tardiamente (Katila, 2005). Aparentemente, a concentração espermática não é um factor crítico na inflamação uterina desde que seja superior ou igual a  $4 \times 10^6$  espermatozóides/mL (Katila, 2005). Também é assinalável a ocorrência de uma maior acumulação de fluido intra-uterino em éguas com idade superior a 16 anos inseminadas com sémen congelado (Watson *et al*, 2001).

Troedsson, em 1999, verificou que não existe nenhuma diferença *in vitro* entre a quimiotaxia induzida por espermatozóides provenientes de sémen fresco ou de sémen congelado (Troedsson *et al*, 2001). Pode-se concluir então que o sémen congelado por si só não induz uma maior inflamação que o sémen fresco (Katila, 2005; Dell' Aqua Jr. *et al*, 2006). No



entanto, como normalmente são utilizados volumes menores de elevada concentração, a resposta inflamatória ao sémen congelado tende a ser mais exuberante quando comprada com a obtida numa inseminação com sémen fresco (Katila, 2005).

A resposta inflamatória uterina após cobrição natural também não difere da obtida numa inseminação artificial com sémen fresco (Katila, 2001) ou com sémen refrigerado diluído (Nikolakopoulos e Watson, 1997). Este facto é de certa forma algo inesperado tendo em conta que o elevado número de bactérias introduzidas directamente no útero durante uma cobrição natural actuará como um estímulo adicional para o aumento da resposta inflamatória.

#### **4.3 Papel do plasma seminal**

O plasma seminal corresponde à porção fluida do sémen. Consiste numa mistura de secreções produzidas pelos testículos, epidídimos e glândulas sexuais acessórias que está envolvida em múltiplas funções espermáticas e eventos que precedem a fertilização (Kareskoski e Katila, 2008). Pode ser isolado dos espermatozóides através de centrifugação ou filtração de um ejaculado.

O plasma seminal tem como principais funções providenciar substrato para transporte dos espermatozóides no útero da égua, facultando e iniciando a maturação dos espermatozóides de modo a conferir-lhes motilidade. Também disponibiliza energia, sobretudo sob a forma de glucose, para aumentar a sobrevivência e motilidade dos espermatozóides, e é responsável pela protecção dos espermatozóides contra as flutuações da pressão osmótica do fluido que os rodeia. Actua ainda como agente de coagulação, função esta que é conferida pelo gel da fracção pós-espermática, e como conservante, prevenindo a oxidação dos restantes componentes bioquímicos (Morel, 1999, 2003).

Em geral, o plasma seminal contém várias substâncias em concentrações muito mais elevadas que nos restantes fluidos corporais (Morel, 1999). Estes componentes possuem extrema importância para o funcionamento e sobrevivência dos espermatozóides.

A fonte dos constituintes do plasma seminal varia de acordo com a espécie e com o número e grau de desenvolvimento das glândulas sexuais acessórias (Garner e Hafez, 2004). A sua composição varia também de acordo com a fracção do ejaculado, visto as glândulas sexuais acessórias libertam o seu conteúdo com uma ordem específica (Kareskoski e Katila, 2008). Na tabela 2 é feito um resumo da composição do plasma seminal de equino.

Embora tenha sido feita uma pesquisa intensa abrangendo a identificação e características bioquímicas das proteínas do plasma seminal, as suas funções específicas não se encontram bem definidas (Kareskoski e Katila, 2008; Morel, 1999), tendo sido sugerido que estas podiam estar envolvidas no processo de capacitação (Morel, 1999). As proteínas,

aparentemente, são responsáveis pelo fornecimento de um revestimento protector aos espermatozóides aumentando, assim, o seu tempo de semi-vida no tracto feminino. Este revestimento pode também ser um pré-requisito para a capacitação (Morel, 1999). Os três maiores grupos de proteínas do plasma seminal de equino são as proteínas tipo Fn-2 (fibronectina tipo 2), as proteínas de secreções ricas em cisteína (CRISP – Cysteine-Rich Secretory Proteins), e espermedesinas. As proteínas *heat shock protein 1* (HSP1) e *heat shock protein 2* (HSP-2), também conhecidas como proteína seminal 1 (SP-1) e proteína seminal 2 (SP-2), são as proteínas presentes em maior quantidade no plasma seminal de garanhão, representando 70-80% da proteína total (Kareskoski e Katila, 2008). O plasma seminal possui também muitas enzimas, incluindo a fosfatase alcalina (FA), a lactato-desidrogenase (LDH), aspartato-aminotransferase (AST) e  $\gamma$ -glutamilttransferase (GGT) (Kareskoski e Katila, 2008). Estudos recentes demonstram também a presença de uma DNase no plasma seminal (Alghamdi e Foster, 2005).

Tabela 2 – Composição e alguns parâmetros do plasma seminal de garanhão (Adaptado de Morel, 1999)

<b>Proteína</b>	1,2-12 mg/mL
<b>Frutose</b>	0,02-0,08 mg/mL
<b>Glucose</b>	0,82 mg/mL
<b>Sorbitol</b>	0,2-0,6 mg/mL
<b>Ácido cítrico</b>	0,08-0,53 mg/mL
<b>Inositol</b>	0,19-0,47 mg/mL
<b>Ergotionina</b>	0,03-1,1 mg/mL
<b>Glicerilfosforilcolina</b>	0,4-3,8 mg/mL
<b>Sódio</b>	2,57mg/mL
<b>Potássio</b>	1,03 mg/mL
<b>Fósforo</b>	0,02-0,07 mg/mL
<b>Cálcio</b>	0,26 mg/mL
<b>Magnésio</b>	0,09 mg/mL
<b>Cloro</b>	4,48 mg/mL
<b><math>\beta</math>-N-Acetilglucosaminidase</b>	625 U/mL
<b>pH</b>	6.2-7.8
<b>Osmolaridade</b>	142-334 mOsm/kg

Para além dos constituintes referidos na tabela 2, o plasma seminal possui também substâncias com características antimicrobianas, como a imunoglobulina A, e uma variedade de substâncias hormonais, incluindo androgénios, estrogénios, prostaglandinas, ocitocina, FSH, LH, CG-LS (Chorionic gonadotrophin-like substance), hormona do crescimento, insulina, glucagon, prolactina, relaxina, TRH e encefalinas (Garner e Hafez, 2004).

O plasma seminal é também conhecido pelas suas propriedades imunossupressoras em muitas espécies, incluindo nos equinos (Alghamdi *et al*, 2004; 2009).

Estudos *in vitro* revelaram que, contrariamente ao que se verifica com os espermatozóides,

o plasma seminal tem a capacidade de inibir a actividade hemolítica do complemento e de suprimir a quimiotaxia e fagocitose dos espermatozóides pelos PMNs, graças à redução do influxo destas células para o útero da égua (Katila, 2001; Watson *et al*, 2001; Troedsson *et al*, 2001; Alghamdi *et al*, 2004; Troedsson, 1999, 2006; Schuberth *et al*, 2008). Tais observações sugerem que o plasma seminal age como modulador da resposta inflamatória uterina sobre os espermatozóides (Troedsson *et al*, 2001; Troedsson, 2006; Samper, 2007). A redução da resposta inflamatória pode revelar-se tanto positiva como negativa. Por um lado, a supressão da fagocitose pode diminuir e atrasar a eliminação de bactérias e espermatozóides do útero. Por outro, a função imunossupressora do plasma seminal pode ser benéfica no caso de inseminações com sémen congelado cujos espermatozóides se encontram mais vulneráveis e, como tal, seriam alvo preferencial dos PMNs e fagocitados mais rapidamente. Assim sendo, a supressão do estímulo quimiotático permite aumentar o número de espermatozóides e o tempo que estes se encontram disponíveis para fertilização (Katila, 2001).

Contudo, todos os estudos *in vivo* demonstraram que a infusão de plasma seminal é responsável por um aumento do número de PMNs no lúmen uterino, tendo mesmo a capacidade de induzir uma maior migração de PMNs que a infusão de soro fisiológico ou de diluidores de sémen (Katila, 2005; Watson *et al*, 2001; Troedsson, 2006; Dell' Aqua Jr. *et al*, 2006; Fiala *et al*, 2007). Esta leucocitose pode estar relacionada com glicoproteínas da família do factor de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ) e outras citocinas presentes tanto no plasma seminal como no leite (Fiala *et al*, 2007). A TGF- $\beta$  é uma citocina extremamente pleiotrópica presente nos fluidos seminais de humanos e diversas espécies de animais. É libertada sob a forma de um precursor latente, que é activado no tracto reprodutivo feminino pela plasmina ou outras enzimas após inseminação (Schubert *et al*, 2008; Fiala, 2004). Embora a sua presença ainda não tenha sido comprovada em equinos, este é o principal factor responsável pela resposta inflamatória após cobrição e é essencial na indução da tolerância imunitária aos antígenos seminais (Fiala, 2004; Fiala *et al*, 2007). Por si só, pode ser quimiotática para uma enorme variedade de células do sistema imunitário, mas aparentemente actua indirectamente através da indução da expressão de citocinas e quimioquinas no tracto genital feminino (Schubert *et al*, 2008). Os efeitos *in vivo* do plasma seminal na presença ou ausência de espermatozóides são também um reflexo parcial de uma ligeira, mas significativa, regulação crescente da expressão da IL-8, o mais potente agente quimiotático para os neutrófilos (Schubert *et al*, 2008).

Troedsson *et al* (2001) descobriram que a presença de plasma seminal numa dose inseminante reduzia a duração da inflamação uterina, tendo conseguido recuperar significativamente mais PMNs às 6 e 12 horas que às 24 horas após inseminação. Embora a magnitude da inflamação uterina observada nos grupos de éguas sujeitas a IA com

espermatozóides na presença de plasma seminal e no grupo de éguas inseminadas com espermatozóides na presença de um diluidor de sémen, determinada pelo pico de PMNs, tenha sido semelhante, não foi observada uma redução da duração da resposta inflamatória ao substituir o plasma seminal por um diluidor de sémen comercial com base de leite (diluidor de Kenney). Assim sendo, é razoável concluir que a inclusão de plasma seminal numa dose inseminante reduz a duração da inflamação uterina induzida pela inseminação (Troedsson, 2006; Troedsson *et al*, 2001). Uma explicação possível para este fenómeno pode ser o efeito estimulador do plasma seminal sobre as contracções uterinas. No entanto, estudos subsequentes demonstraram que éguas inseminadas com espermatozóides na presença de plasma seminal apresentaram menos contracções uterinas que éguas inseminadas com espermatozóides ressuspensos num diluidor de leite, o que revela a necessidade de mais estudos para confirmar tais resultados (Katila, 2005).

Seguindo este raciocínio, éguas inseminadas com sémen congelado, do qual é retirado virtualmente todo o plasma seminal, desenvolvem uma resposta inflamatória mais duradoura. Este facto pode predispor algumas éguas, que normalmente seriam capazes de limpar o seu útero de todo o conteúdo inflamatório em tempo útil, a desenvolverem endometrites persistentes resultando invariavelmente numa redução da capacidade de concepção. Contudo, não se encontra devidamente esclarecido se a redução do plasma seminal durante o processamento do sémen congelado é suficiente para se suprimir o efeito modulador do plasma seminal na endometrite pós coital (Troedsson, 2006, 2008).

Em protocolos de IA com sémen fresco, a cada 48 horas até ocorrer a ovulação numa égua normal, a limpeza uterina entre inseminações não é problema porque o intervalo entre inseminações é suficientemente amplo para que esta seja completa. No entanto, numa IA com sémen congelado, é por vezes complicado prever com exactidão o momento da ovulação. Isto força o médico veterinário a realizar uma segunda inseminação em 12 a 24 horas após a primeira inseminação, se a égua não ovular. Assim, quando as éguas são inseminadas duas vezes em 24 horas, os mecanismos de limpeza uterina não têm tempo para eliminar todo o conteúdo inflamatório resultante da primeira inseminação, e como tal os espermatozóides provenientes da segunda inseminação são expostos a um ambiente uterino inflamatório hostil que demonstrou *in vitro* ser prejudicial tanto para a motilidade como para o vigor dos espermatozóides. Ocorre também uma ligação excessiva dos espermatozóides aos PMNs da secreção uterina. Esta ligação leva à formação de grandes aglomerados de células com reduzida mobilidade, facto que reduz o número de espermatozóides férteis da segunda inseminação que ficam disponíveis para serem transportados para o oviducto (Troedsson *et al*, 2001; Troedsson, 2006, 2008).

A adição do plasma seminal, embora não aumente as características de mobilidade dos espermatozóides, comprovou ser capaz de reduzir significativamente não só a formação de

agregados entre espermatozóides e PMNs como também a opsonização dos espermatozóides, protegendo-os da fagocitose. Este facto é evidente quando as éguas são inseminadas na presença de inflamação (Troedsson *et al*, 2001). Esta afirmação é igualmente sustentada por Alghamdi *et al* (2004) que verificou que ao efectuar uma IA com espermatozóides viáveis 12 horas após a indução de uma inflamação uterina por inseminação de espermatozóides mortos, a taxa de concepção era muito inferior na ausência de plasma seminal (5%) do que quando se recorre a inseminação de espermatozóides na presença de plasma seminal (75%). Estes resultados permitem também explicar as boas taxas de concepção obtidas na reprodução de cavalos selvagens, apesar das múltiplas cobrições por estro. No entanto, estes resultados entram de certo modo em conflito com as observações clínicas de que éguas inseminadas com sémen congelado, que muito frequentemente contém menos de 5% de plasma seminal. A presença de uma inflamação uterina resultante de uma inseminação prévia não aparenta ser um obstáculo significativo pois estas éguas conseguem conceber com relativa facilidade, o que revela que esta pequena quantidade de plasma seminal é suficiente para protecção dos espermatozóides (Troedsson, 2006, 2008; Katila, 2005).

Recentemente foi iniciado o estudo da caracterização e identificação dos componentes do plasma seminal responsáveis pela supressão imunitária. Troedsson, em 1999, descobriu que a fracção com maior efeito supressor sobre a quimiotaxia dos PMNs corresponde a uma molécula de baixo peso molecular (50-100 kDa) (Troedsson *et al*, 2001), não se sabendo no entanto se estarão envolvidas uma ou mais moléculas (Alghamdi *et al*, 2004).

Estudos subsequentes revelaram que tratamentos térmicos do plasma seminal a 95°C durante 45 minutos, ou a adição de carvão, removem parcialmente o efeito supressor do plasma seminal, tendo sido possível obter a inibição completa quando aplicado o tratamento de carvão após o tratamento térmico (Troedsson *et al*, 2001). A digestão com proteinase K resultou igualmente na perda total da actividade imunossupressora do plasma seminal, o que confirma que o componente do plasma seminal responsável pela modulação da resposta inflamatória é uma substância de natureza proteica, podendo-se tratar de um péptido, uma proteína, uma lipoproteína, uma glicoproteína ou um proteoglicano. Esta substância não é inactivada por congelação, diálise, precipitação com sulfato de amónia ou pelo aquecimento durante 3 horas a 56°C (Alghamdi *et al*, 2004).

Alghamdi *et al*. (2004) determinaram que concentrações de proteínas do plasma seminal de 1mg/mL reduzem significativamente a ligação entre os espermatozóides e os PMNs, e que concentrações de 6 mg/mL as reduzem a um nível semelhante ao observado com plasma seminal total. Isto sugere que tanto a redução da ligação espermatozóides-PMNs, como a redução da fagocitose e quimiotaxia dos PMNs por adição de plasma seminal podem estar dependentes da concentração proteica do plasma seminal.

A descoberta de que as proteínas precipitadas do plasma sanguíneo e os diluidores não reduzem a ligação entre espermatozóides e PMNs demonstra que esta actividade imunossupressora é específica do plasma seminal (Alghamdi *et al*, 2004).

Para que os espermatozóides sejam fagocitados têm que, em primeira instância, ligar-se à superfície dos PMNs. Esta ligação pode ser mediada quer por opsonização quer por uma ligação específica entre um receptor e um ligando.

O plasma seminal protege os espermatozóides da fagocitose através da inibição desta ligação. Esta função protectora pode ser específica de certas subpopulações de espermatozóides e/ ou ocorrer apenas durante uma janela de tempo temporária, sendo sugerido que este intervalo de tempo possa durar pelo menos 4 horas após a inseminação artificial (Alghamdi *et al*, 2004).

No seu estudo, Katila *et al* (2004) obtiveram taxas de concepção exactamente iguais quando inseminaram espermatozóides com plasma seminal ou então ressuspendidos em diluidor de base de leite após remoção total do plasma seminal por centrifugação. Tais resultados podem ser explicados pelo facto de a centrifugação não remover as proteínas do plasma seminal ligadas aos espermatozóides (Katila, 2005).

Está provado que os espermatozóides anormais e apoptóticos são mais susceptíveis de serem fagocitados pelos leucócitos. No entanto, Alghamdi *et al* (2004) verificaram que, na ausência de plasma seminal, até os espermatozóides viáveis com capacidade fertilizante são eliminados por fagocitose. Estudos recentes sugerem que o efeito do plasma seminal sobre a ligação entre PMNs e espermatozóides é específica para os espermatozóides vivos e viáveis, não afectando a ligação ou fagocitose de espermatozóides mortos (Alghamdi e Troedsson, 2004) ou bactérias (Troedsson, 2008).

Geralmente a ligação espermatozóide-PMN, pode ser mediada quer por uma ligação directa com a membrana celular através de um mecanismo de ligação directa receptor-ligando ou mediada por outros factores como o complemento ou anticorpos designada por opsonização, quer por aprisionamento dos espermatozóides em redes extracelulares de DNA dos neutrófilos activados (NETs) resultantes da expulsão do seu DNA nuclear e proteínas associadas (e.g. histonas) (Troedsson, 2006, 2008; Alghamdi *et al*, 2009; Alghamdi e Foster, 2005). A formação das NETs é dependente do momento e da dose. Embora tenha sido demonstrado que as NETs não resultam do extravasamento durante a desintegração celular, não se pode excluir a possibilidade de corresponderem a uma fase inicial do programa de morte celular dos neutrófilos (Alghamdi e Foster, 2005). Como a formação das NETs se baseia em DNA e porque já foi isolada uma DNase no plasma seminal, coloca-se a hipótese de os espermatozóides serem libertados destas NETs através desta DNase seminal (Alghamdi *et al*, 2009; Schubert *et al*, 2008). Esta DNase desempenha então um importante papel na redução da ligação entre espermatozóides e PMNs e da formação dos

aglomerados celulares, levando a uma melhoria da mobilidade dos espermatozóides. Esta enzima não inibe as actividades bactericidas dos neutrófilos. Contudo, a adição de plasma seminal total resulta numa maior redução da ligação espermatozóide-PMNs quando comparada com a adição simples da DNase, o que sugere que estarão envolvidas outras proteínas seminais neste mecanismo (Alghamdi e Foster, 2005).

Estudos recentes referem que 12 horas após uma infusão intrauterina de plasma seminal, ocorre um aumento da expressão do RNAm da IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  e ciclo-oxigenase 2 (COX-2) no endométrio (Nash *et al*, 2010).

Conclui-se portanto que são necessários mais estudos para que seja identificado o mecanismo exacto pelo qual o plasma seminal desempenha a imunossupressão no endométrio. Tal informação será uma mais-valia para a aquisição de novos conhecimentos sobre a fisiologia e a imunologia reprodutiva, principalmente quanto à capacidade do tracto reprodutivo feminino tolerar os antigénios masculinos.

#### **4.4 Papel dos diluidores**

Qualquer que seja o modo de armazenamento, todo o sémen a utilizar num programa de inseminação artificial deve ser sempre misturado com diluidores de sémen adequadamente formulados para aumentar a sobrevivência dos espermatozóides durante o intervalo de tempo entre a recolha e a inseminação (Aurich, 2011, Morel, 1999, Blanchard *et al.*, 2003).

A composição dos diluidores pode variar muito, mas a maioria é baseada em leite ou gema de ovo (Morel, 1999). Os diluidores de sémen mais utilizados por todo o Mundo em reprodução de equinos são os diluidores formulados à base de leite (leite em pó desnatado magro e glucose), podendo ser preparados no laboratório ou fórmulas comerciais (Blanchard *et al*, 2003; Aurich, 2011). Diluidores com base em gema de ovo providenciam resultados comparáveis aos dos diluidores de leite mas são muito mais complicados de processar e, geralmente, não resultam em melhor qualidade ou fertilidade do sémen. O diluidor com base de gema de ovo mais utilizado na Europa é o diluidor glicina-gema de ovo (D11 ou diluidor de Dimitropoulos) (Aurich, 2011). Estes diluidores são primariamente utilizados para armazenamento, não sendo muito utilizados na avaliação do sémen devido à sua opacidade. O seu sucesso é atribuído às lipoproteínas, mais concretamente à sua fracção lipídica composta principalmente por fosfolípidos, que se ligam firmemente à membrana plasmática dos espermatozóides (Morel, 1999). A natureza dos efeitos positivos de ambos os tipos de diluidores permanece mais ou menos desconhecida (Aurich, 2011).

Recentemente foram desenvolvidas novas bases para diluidores de sémen com o intuito não só de criar diluidores com uma composição definida e constante como também de reduzir os efeitos potencialmente prejudiciais de alguns componentes presentes em

substâncias biológicas como o leite e a gema de ovo (Aurich, 2011).

O INRA-96 (IMV, L'Aigle, França) é um diluidor comercial muito popular e bem tolerado pela grande maioria dos espermatozóides de garanhões. Consiste numa solução salina equilibrada baseada em produtos de leite e enriquecida com fosfocaseinatos (Aurich, 2011).

Todo o sémen de Mamífero contém invariavelmente uma microflora natural que, em condições normais, não representa qualquer perigo de infecção para as éguas cobertas. No entanto, em éguas imunologicamente comprometidas inseminadas com um sémen muito contaminado podem desenvolver de uma infecção uterina reduzindo, consequentemente, a capacidade de concepção (Morel, 1999). Assim sendo, o crescimento da microflora do sémen é controlado pela adição de antibióticos. São exemplo de antibióticos comumente utilizados a polimixina B (200-100 U/mL), a estreptomicina, a penicilina (1000-1200 U/mL), a gentamicina (100-1000 µg/mL), a amicacina (100-1000 µg/mL) e a ticarcilina (100-1000 µg/mL) (Blanchard *et al.*, 2003). Na Europa são mais utilizadas a penicilina e a gentamicina. Já nos EUA opta-se preferencialmente pela amicacina, penicilina e pela combinação ticarcilina/ ácido clavulânico (Aurich, 2011).

Independentemente da utilização de antibióticos, devem ser sempre tomadas medidas de higiene óptimas durante a recolha e processamento do sémen. Embora estas medidas não eliminem por completo a presença de microrganismos no sémen, permitem uma redução substancial da contaminação bacteriana da amostra (Aurich, 2011, Morel, 1999).

O papel dos diluidores na inflamação endometrial é ainda desconhecido mas, à semelhança do que se observa com o plasma seminal, a sua infusão simples é passível de resultar num influxo de PMNs para o endométrio e para o lúmen uterino (Palm *et al*, 2006; Fiala *et al*, 2002).

Palm *et al* (2006) estudaram as diferenças da resposta inflamatória uterina após infusão de soro fisiológico, plasma seminal, diluidores de base de leite e de gema de ovo, através da contagem do número total de leucócitos e, em particular, do número de PMNs nas camadas superficial e profunda do endométrio em amostras recolhidas por biópsia uterina. Os valores obtidos foram comparados entre si e também com uma biópsia-controlo de éguas em estro não submetidas a qualquer tratamento. Foi-lhes possível verificar que, de todos os tratamentos, a infusão de diluidor de gema de ovo fora a que resultara no menor influxo de PMNs para as camadas superficiais do endométrio, valores que não foram muito discrepantes dos observados nas éguas-controlo. Os tratamentos com plasma seminal e soro fisiológico apresentaram um número de PMNs nas camadas superficiais do endometrio superiores ao tratamento anterior, apresentando valores semelhantes entre si. Com efeito, o tratamento mais irritante para o endométrio e, logo, com maior número de células inflamatórias na camada superficial que as éguas controlo ou qualquer outro tratamento, foi de longe o de diluidor baseado em leite. Estes resultados foram posteriormente confirmados



por Palm *et al* (2008).

Tais discrepâncias não foram observadas na camada profunda do endométrio e, como esperado, o número de células inflamatórias observado nesta camada foi consideravelmente inferior ao verificado na camada superficial, independentemente do tratamento instituído.

Foi sugerido que a reacção mais exuberante aos diluidores de base de leite pode resultar de uma reacção de hipersensibilidade às caseínas e lactoglobulinas do leite, mas tal aparenta ser improvável uma vez que nestes estudos todas as éguas apresentaram igual resposta inflamatória positiva semelhante com proliferação de PMNs nas camadas endometriais quando submetidas à infusão intrauterina deste tipo de diluidores. Os diluidores de leite contêm caseinatos, proteínas do soro de leite, vários açúcares e glicina, todavia não se sabe ainda quais destas substâncias são responsáveis pela resposta inflamatória observada (Palm *et al*, 2008).

A menor reacção inflamatória observada nas éguas tratadas com diluidor de gema de ovo pode ser um reflexo quer de uma redução geral na resposta inflamatória a este agente ou ao facto de existirem diferentes tempos de reacção endometrial, i.e., uma inflamação mais precoce ou tardia consoante o tratamento instituído. Não se pode igualmente excluir a possibilidade de alguns componentes da gema de ovo actuarem como moduladores imunitários do endométrio e induzirem uma resposta diferente dos diluidores de leite ou mesmo do plasma seminal. A gema de ovo pode também ser responsável por reacções de hipersensibilidade em algumas éguas (Palm *et al*, 2006). Alghamdi *et al* (2009) examinou o impacto do diluidor de gema de ovo na ligação entre os espermatozóides e os PMNs, não tendo verificado nenhum efeito significativo.

Palm *et al* (2006) não observaram nenhuma diferença na concentração de leucócitos ou na percentagem dos diferentes leucócitos nos líquidos de lavagem uterina 12 horas após qualquer tratamento. Este facto parece sugerir que os resultados obtidos numa citologia por lavagem uterina com pequeno volume depende essencialmente do momento em que esta é realizada.

Alguns estudos relatam que, 12 horas após uma infusão de diluidores de sémen, ocorre um aumento da expressão do RNAm da IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  e COX-2 no endométrio (Nash *et al*, 2010; Palm *et al*, 2008).

A inseminação de espermatozóides na presença de plasma seminal diminui consideravelmente a inflamação uterina às 24 horas após IA quando comparada com a inseminação de espermatozóides ressuspendidos num diluidor. O mesmo não se verifica 6 ou 12 horas após IA onde a resposta ao plasma seminal é bastante superior (Troedsson *et al*, 2001). Tais informações sugerem que o momento e intensidade da resposta inflamatória depende do estímulo induzido, sendo a resposta a um diluidor mais duradoura e tardia que a resposta ao plasma seminal.

#### **4.5 Papel do local de deposição de sémen e momento da IA**

Não se encontra ainda plenamente esclarecido se a IA intra-cornual profunda provoca uma maior ou menor inflamação do endométrio quando comparada com a IA convencional no corpo uterino (Güvenc *et al*, 2005).

Anteriormente estava postulado que a IA intra-cornual profunda resultava numa endometrite pós-coital mais severa que a IA no corpo uterino, particularmente quando o volume da dose inseminante era reduzido.

Mais recentemente, Güvenc *et al* (2005) não observaram nenhuma diferença significativa no número de PMNs entre inseminações no corpo ou no corno uterino. No entanto, éguas submetidas a inseminação intra-cornual profunda com pequenos volumes (20 mL) apresentaram uma redução significativa da acumulação de fluido intra-uterino, do que éguas inseminadas com o mesmo volume mas no corpo uterino. Os autores referidos verificaram também que nas inseminações convencionais, ocorre invariavelmente uma maior acumulação de fluido intra-uterino, independentemente do volume de inseminado utilizado. Volumes de 20 e 200 mL despoletaram a formação de volumes de fluido intra-uterino semelhantes entre si e semelhantes ao volume de fluido observado numa inseminação intra-cornual profunda com inseminado de 200 mL.

Assim, a informação científica mais recente propõe que não há grande discrepância na reacção inflamatória após inseminação de um ejaculado de volume fixo independentemente do local de deposição (Güvenc *et al*, 2005; Katila, 2005). Tal sugere que a introdução da ponta da pipeta de inseminação na ponta do corno uterino, por orientação transrectal, não constitui um estímulo irritante adicional para as mucosas. Este procedimento não afecta a magnitude da resposta inflamatória uterina de éguas 24 horas após inseminação e, portanto, não aumenta o risco de desenvolverem uma endometrite (Güvenc *et al*, 2005).

Aparentemente, a mera manipulação transrectal do útero e do cérvix durante uma inseminação pode ser suficiente para levar a um aumento transitório dos PMNs no útero (Nikolakopoulos e Watson, 1997; Fiala *et al*, 2007).

Watson *et al* (2001) formularam uma hipótese na qual a IA pós-ovulatória parece estar mais predisposta a induzir uma acumulação de fluido de reacção inflamatória que a IA pré-ovulatória. Isto dever-se-á essencialmente ao aumento da progesterona poucas horas após a ovulação, o que está associado à supressão dos mecanismos de defesa imunitários bem como dos mecanismos mecânicos. No entanto, no seu estudo, aqueles autores não verificaram nenhuma influência significativa deste factor na acumulação de fluido uterino 12 horas após inseminação artificial com sémen congelado.

#### IV – RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA APÓS INSEMINAÇÃO: ESTUDO RETROSPECTIVO DE 27 ÉGUAS

##### 1. Objectivo

Este trabalho teve como objectivo estudar a influência de parâmetros como a idade e estado reprodutivo da égua, tipo de sémen utilizado na IA, presença de plasma seminal, e o momento e técnica de inseminação artificial utilizada, além das características do útero antes da inseminação, no estabelecimento de uma resposta inflamatória uterina após a inseminação artificial bem como a sua repercussão na concepção.

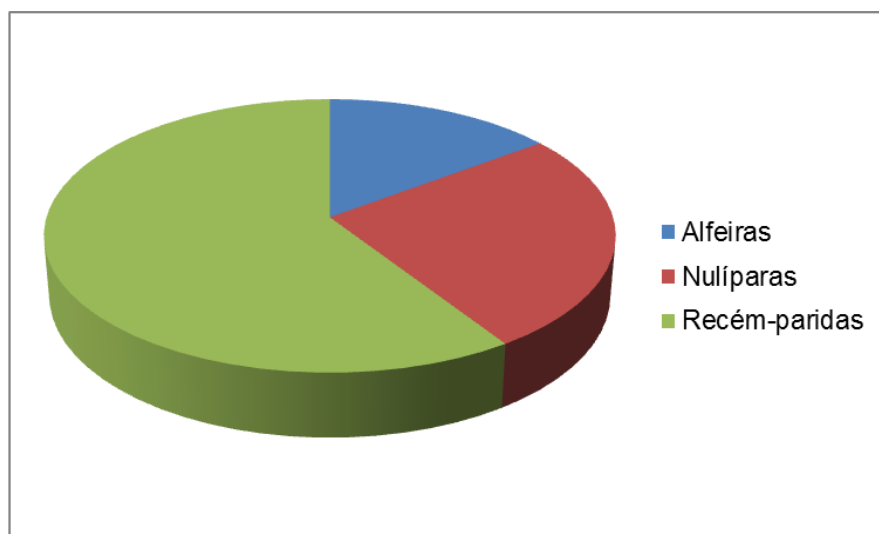
##### 2. Materiais e Métodos

###### Éguas:

Foram avaliadas 27 (n=27) éguas, incluindo tanto éguas internadas na clínica como éguas monitorizadas em extensivo. Apresentavam idades compreendidas entre os 4 e os 21 anos, média de 12 anos, onde 40,7% dos indivíduos (n=11) tinha idade igual ou superior a 15 anos.

No que respeita ao estado reprodutivo relativo a anteriores concepções, 14,8% das éguas (n=4) eram nulíparas, 59,3% eram recém-paridas (n=16) e 25,9% (n=7) eram alfeiras (Figura 19). As médias de idade destes grupos de éguas eram 5, 12 e 14 anos , respectivamente.

Figura 19 – Gráfico ilustrativo da distribuição dos estados reprodutivos das éguas na amostra



**Garanhões e recolha de sémen:**

Para as IAs foi utilizado sémen proveniente de 10 garanhões diferentes, com idades compreendidas entre os 8 e os 17 anos ( $\bar{x}$ =12 anos), recolhido com recurso a vaginas artificiais dos modelos Colorado e Missouri, com utilização de uma manga estéril com filtro incorporado, lubrificação com gel estéril não espermicida, e recolha em manequim fixo ou por monta numa égua residente.

**Processamento do sémen:**

Todo o sémen foi convenientemente avaliado após a sua recolha, medindo-se o seu volume e concentração num espectrofotómetro. O sémen recolhido foi processado de forma a ser utilizado fresco e refrigerado. Em ambas as situações o sémen foi sempre devidamente diluído num diluidor de sémen de base de leite (INRA-96<sup>®</sup>) previamente aquecido à temperatura de 37°C num banho-maria ou estufa, numa proporção de 1:1 (sémen:diluidor) no caso do sémen fresco e 1:3 no caso do sémen refrigerado. Entretanto foi necessário proceder à centrifugação de 11,6% (n=5) dos ejaculados recolhidos devido ao seu elevado volume e menor concentração espermática. A centrifugação foi efectuada a 2400 rpm durante 10 minutos. Finalizado este passo, retirou-se parte do sobrenadante por sucção para uma seringa, deixando-se sempre cerca de 10% do volume total, e ressuspendeu-se o botão de espermatozóides com o mesmo diluidor de base de leite aquecido na proporção adequada. Após diluição, procedeu-se sempre à avaliação microscópica da motilidade espermática e, posteriormente, foram realizados os cálculos do número de doses e volume do inseminado a utilizar.

Na ausência de protocolo de descongelação específico, na IA com sémen congelado o sémen foi descongelado segundo a técnica adoptada no Centro de Recolha e Congelação de Sémen Equino da Lusopecus, ou seja, foi descongelado em banho-maria a 45°C durante 20 segundos.

**Monitorização prévia:**

Todas as éguas foram monitorizadas previamente à IA com recurso à palpação e ecografia transrectais. A ecografia foi realizada com utilização de um ecógrafo com sonda linear transrectal de 5 MHz, tendo-se registado todas as características ecográficas do útero e ovários até ao momento da inseminação. Foi dada especial relevância à avaliação de algumas das características uterinas, tendo-se avaliado e quantificado o edema uterino com recurso a uma escala de sinais (- a +++), e efectuada o despiste de possíveis alterações murais, como massas e quistos, e da presença de líquido intra-uterino.

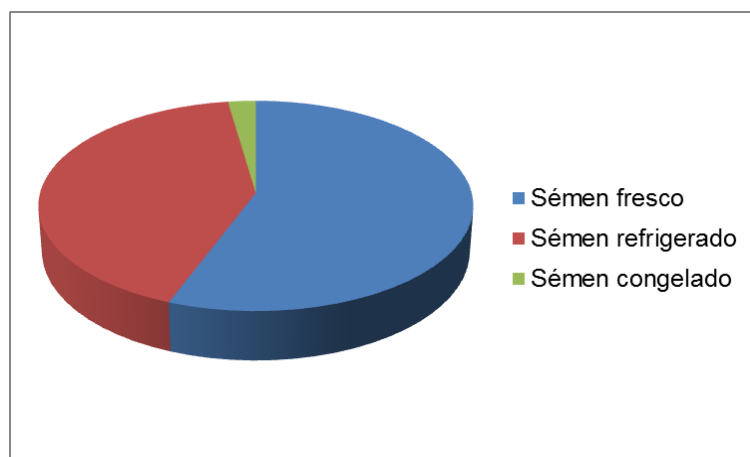
### **Inseminação artificial:**

Antes de qualquer IA, protegeu-se a cauda da égua com uma ligadura e procedeu-se à higienização da sua área perineal com uma solução de 4% de iodopovidona espuma (e.g. Betadine® Espuma) , seguida de um abundante enxaguamento e secagem com papel seco, limpo e descartável. Aquando da monitorização por palpação e ecografia transrectais, foi providenciado o esvaziamento manual do conteúdo fecal do recto. Todas as éguas a inseminar foram colocadas numa manga de contenção.

Foi sempre utilizada uma pipeta de inseminação estéril de 22 polegadas, guiada e introduzida no útero pela técnica transvaginal, incluindo as inseminações intracornuais profundas. Nestas inseminações, após introdução da pipeta de inseminação no útero pela vagina, procedeu-se à sua orientação para a extremidade do corno uterino ipsilateral ao ovário ovulatório, por via transrectal. Em todas as situações foi utilizada uma luva de palpação rectal estéril e colocada uma quantidade reduzida de lubrificante estéril não espermicida nas costas da mão protegida.

Foram realizadas no total 43 inseminações artificiais (n=43) o que perfaz uma média de 1,59 inseminações/égua inseminada. Destas inseminações 55,8% (n=24) foram realizadas com sémen fresco, 41,9% (n=18) com sémen refrigerado e 2,3% (n=1) com sémen congelado (figura 20).

Figura 20 – Gráfico representativo da distribuição das inseminações realizadas com os vários tipos de sémen



Apenas 6,8% das inseminações (n=3) foram intra-cornuais profundas, correspondendo à inseminação com sémen congelado e às duas inseminações com sémen fresco cujos ejaculados eram de volume reduzido mas concentrados. Foi realizada apenas uma (n=1) inseminação artificial pós-ovulatória, inseminação esta efectuada com sémen fresco.

### Monitorização após IA:

24 horas após cada inseminação artificial foi efectuada uma nova monitorização, mas desta feita para avaliar a presença e magnitude da inflamação uterina. Estes elementos foram caracterizados recorrendo à ecografia transrectal, a uma lavagem uterina de baixo volume e subsequente citologia do líquido de lavagem.

#### • *Ecografia Transrectal*

Este exame complementar foi realizado com o intuito de confirmar a ovulação, mas acima de tudo, para avaliar as características do útero, em particular a presença, a quantidade e ecogenicidade de fluido intra-uterino e ainda a presença de edema uterino anormal. À semelhança da avaliação ecográfica antes da IA, esta monitorização foi também realizada com um ecógrafo de sonda linear transrectal de 5MHz.

#### • *Lavagem Uterina*

Todas as éguas com suspeita de presença líquido intra-uterino, i.e. éguas que apresentaram uma imagem ecográfica compatível com a presença de um conteúdo intrauterino anecogénico ou hipoeogénico, foram submetidas a lavagens uterinas com recurso a uma infusão de um pequeno volume (100mL) de Lactato de Ringer estéril através de um cateter de lavagem uterina. Este líquido foi depois recuperado por gravidade e foi avaliado quanto às suas características físicas gerais como a cor, a turvação e o volume, além de se terem observado outros elementos relevantes como presença de detritos ou de floculação. Sempre que se considerou necessário, foram posteriormente realizadas novas lavagens uterinas com maiores volumes Lactato de Ringer com intuito terapêutico (Figura 21).

Figura 21 – Exemplo de líquidos de lavagem terapêutica obtidos de 3 éguas com diferentes reacções inflamatórias uterinas 24 horas após IA (original)

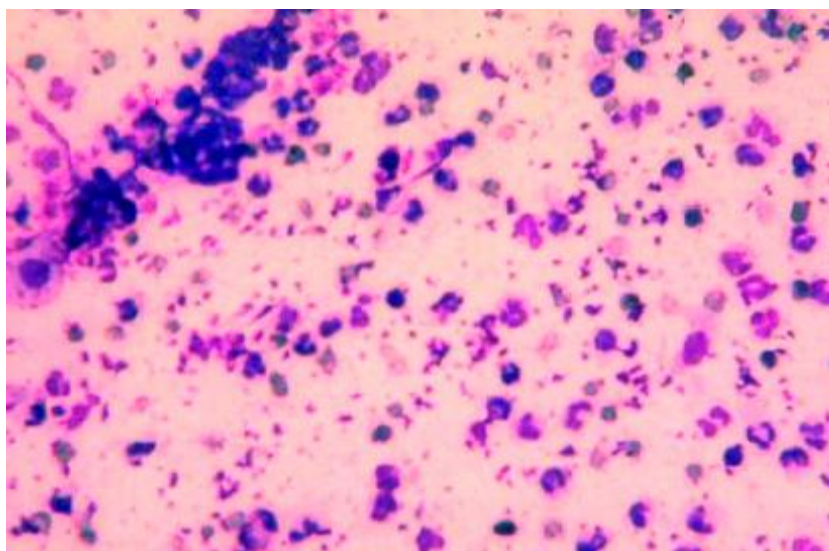


Legenda: A – Líquidos resultantes da lavagem uterina de uma égua com reacção pós-inseminatória muito exuberante, ordenados da primeira (esquerda) para a última lavagem (direita). B – Líquidos de lavagem uterina de uma égua com resposta inflamatória ordenados da primeira (esquerda) para a última lavagem (direita). Líquidos turvos. C – Líquido controlo (esquerda) e líquido de lavagem uterina obtido de égua com resposta inflamatória uterina (direita). Líquido ligeiramente turvo e de cor avermelhada. Esta cor resultou de uma lesão endometrial e/ou cervical efectuada involuntariamente durante o procedimento de lavagem.

- *Citologia Endometrial*

Foi efectuada uma citologia da amostra do líquido de lavagem, após a realização de um esfregaço que foi posteriormente corado com uma coloração rápida de Wrigth Giemsa, o Diff-Quik®. Nenhum dos líquidos de lavagem foi submetido a centrifugação. O esfregaço corado foi então observado ao microscópio óptico numa ampliação de 400x (figura 22). Foram avaliados o número, a morfologia e o tipo de células inflamatórias presentes, bem como a presença de eritrócitos, microrganismos, células epiteliais do endométrio e de descamação e, eventualmente, espermatozóides, e quanto ao conteúdo do fundo em detritos.

Figura 22 – Exemplo de uma citologia endometrial de uma égua com inflamação uterina (400x) onde é possível observar um grande número de neutrófilos dispersos por todo o campo microscópico (Adaptado de Ley, 2004).



A percentagem total de neutrófilos foi obtida avaliando o rácio de neutrófilos para células epiteliais. O fundo da citologia foi classificado quanto à presença de detritos como limpo, quantidade ligeira, com menos de 25% de ocupação do campo (+); moderada, com 25 a 75% de ocupação do campo (++); ou elevada de detritos, com mais de 75% ocupação do campo microscópico (+++). A contaminação bacteriana foi igualmente quantificada recorrendo a uma escala de sinais de + (contaminação ligeira) a +++ (contaminação severa).

#### **Diagnóstico de gestação:**

O diagnóstico de gestação foi efectuado precocemente recorrendo-se à palpação e ecografia tranrectal, 15 dias após comprovação da ovulação.

### **Análise estatística**

Todos os dados obtidos foram registados e organizados utilizando o software Microsoft Excel 2010<sup>®</sup>. Estes foram posteriormente analisados recorrendo ao programa de estatística Rcommander<sup>®</sup> versão 1.7 para o Windows.

Em virtude dos número reduzido de amostras foram utilizados dois testes não paramétricos: o Teste Exacto de Fisher e o Teste de Wilcoxon. O Teste Exacto de Fisher foi utilizado para analisar a influência das diferentes variáveis qualitativas tais como o estado reprodutivo da égua, a presença de líquido, o local de deposição do sémen, a presença de plasma seminal, o tipo de sémen utilizado na IA, o momento da IA, o tipo de IA e as características do útero antes da IA, no desenvolvimento da inflamação uterina. Foi também utilizado para relacionar a presença de inflamação uterina com o diagnóstico de gestação. Já o Teste de Wilcoxon foi utilizado para analisar a influência da variável “idade” no desenvolvimento da inflamação uterina após IA.

O nível de significância adoptado foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## **3. Resultados**

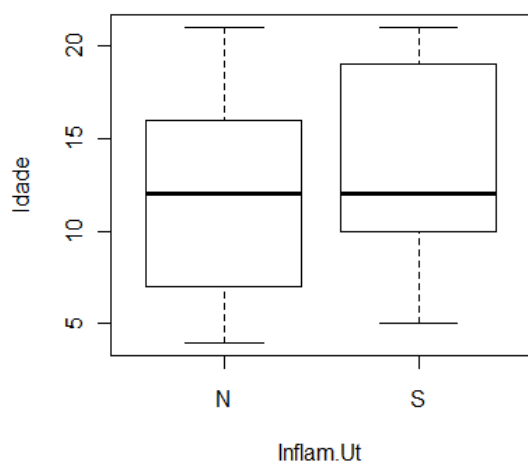
### **Idade da égua:**

Das 27 éguas avaliadas, 37,04% ( $n=10$ ) apresentaram sinais ecográficos e citológicos compatíveis com uma inflamação uterina pós-inseminatória 24 horas após IA.

Após tratamento dos dados verificou-se que a média das idades do grupo de éguas que desenvolveram uma resposta inflamatória uterina após IA ( $\bar{x}=13$  anos) é ligeiramente superior à média das idades das éguas pertencentes ao grupo que não desenvolveu qualquer resposta inflamatória uterina à IA ( $\bar{x}=11$  anos). Para além disso, foi possível constatar que a maioria das éguas sem resposta inflamatória possuíam uma idade compreendida entre os 7 e os 16 anos, sendo portanto ligeiramente mais novas que a maioria das éguas com resposta inflamatória uterina após IA, que por sua vez possuíam uma idade compreendida entre os 10 e os 19 anos (figura 23). No entanto este resultado não é estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ). A mediana de ambos os grupos é idêntica ( $\tilde{x}=12$  anos).



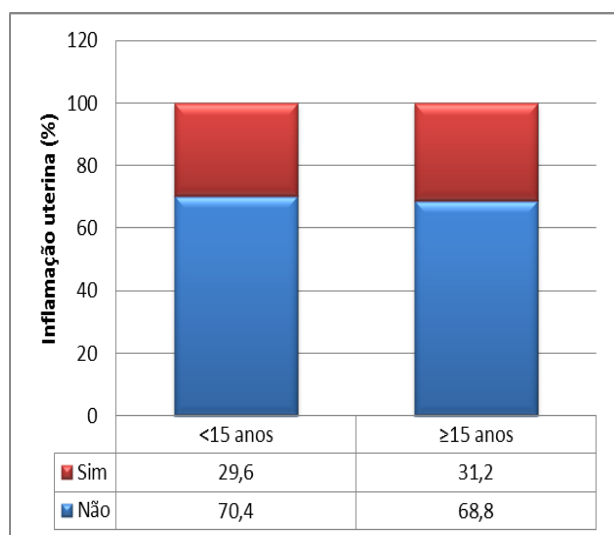
Figura 23 – Gráfico ilustrativo da relação entre a idade e a presença de inflamação uterina



Legenda: Inflam. Ut. – Inflamação uterina, N- Não (sem inflamação uterina), S – Sim (com inflamação uterina)

Do total das éguas analisadas, 37,03% (n=10) possuíam idade superior ou igual a 15 anos. Verificou-se ainda que 68,8% (n=11) das inseminações realizadas em éguas com idade igual ou superior a 15 anos e que 70,4% (n=19) das inseminações realizadas em éguas com idade inferior a 15 anos não resultaram numa inflamação uterina após IA (Figura 24). Estes resultados não são discrepantes entre si nem revelam uma possível influência deste limiar de idade no desenvolvimento de uma resposta inflamatória uterina após IA ( $p>0,05$ ).

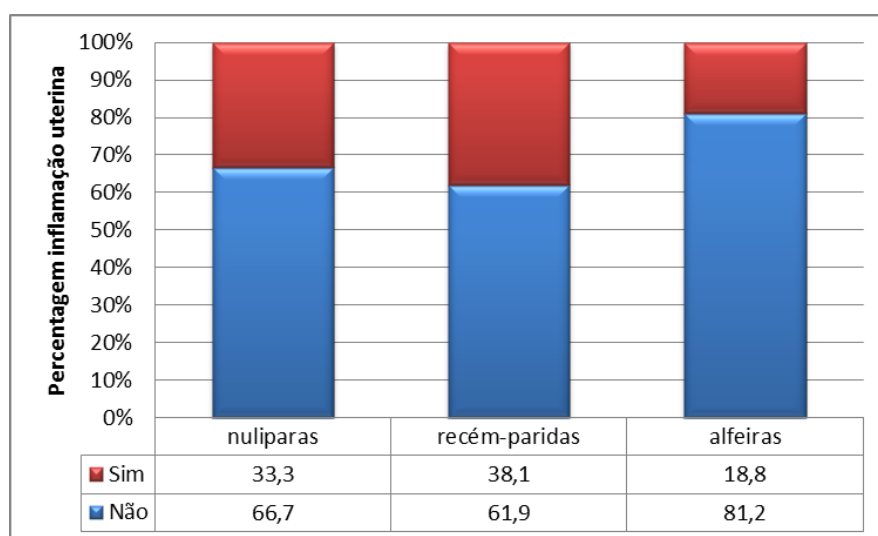
Figura 24 – Representação gráfica da incidência da inflamação uterina nos grupos de éguas com idade <15 anos e  $\geq 15$  anos.



### Estado reprodutivo da égua:

Após tratamento dos dados obtidos foi possível constatar que as éguas nulíparas, as recém-paridas e as alfeiras apresentaram uma incidência de inflamação uterina após inseminação artificial de 33,3% (n=2), 38,1% (n=8) e 18,8% (n=3), respectivamente (Figura 25). Verificou-se também que todos os grupos de éguas apresentaram uma diferença considerável entre a percentagem de éguas com e sem inflamação uterina após IA, sendo esta diferença particularmente evidente no grupo das éguas alfeiras. No entanto, estes resultados não são estatisticamente significativos ( $p>0,05$ ).

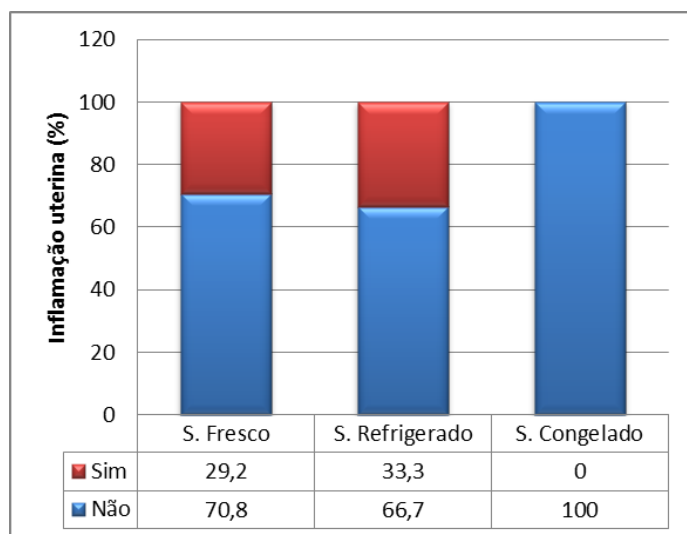
Figura 25 – Representação gráfica da relação entre o estado reprodutivo das éguas e o desenvolvimento da resposta inflamatória uterina



### Tipo de sémen:

Das 43 inseminações realizadas, 24 foram efectuadas com sémen fresco diluído (1:1) e 18 com sémen refrigerado, tendo-se observado a presença de inflamação uterina pós-inseminatória em 29,16% (n=7) das inseminações com sémen fresco e 33,3% (n=6) das inseminações com sémen refrigerado (Figura 26). Observando a mesma figura pode-se também verificar que as inseminações com sémen fresco e com sémen refrigerado apresentam uma maior percentagem de inseminações que não resultaram numa inflamação uterina quando comparada com a percentagem de inseminações que despoletaram a dita inflamação uterina. Foi realizada apenas uma inseminação artificial com sémen congelado que não resultou numa resposta inflamatória uterina evidente. Aparentemente este factor não influencia o desenvolvimento da resposta inflamatória uterina após IA ( $p>0,05$ ).

Figura 26 – Gráfico ilustrativo da relação entre a incidência da inflamação uterina e o tipo de sêmen utilizado na IA



### Presença de plasma seminal:

86,05% das inseminações (n=37) foram efectuadas com ejaculados não centrifugados, das quais, 29,7% (n=11) resultaram em resposta inflamatória uterina. 13,95% (n=6) das inseminações realizadas foram efectuadas com sêmen centrifugado incluindo-se neste grupo a inseminação artificial realizada com sêmen congelado. Destas, 33,3% (n=2) apresentaram sinais de resposta inflamatória uterina (Figura 27 e Tabela 3). Verifica-se também que, para ambos os grupos, a percentagem de éguas com resposta inflamatória uterina é consideravelmente inferior à de éguas sem reacção. Contudo os resultados obtidos não aparentam reflectir uma influência do plasma seminal na resposta inflamatória uterina ( $p>0,05$ ).

Figura 27 – Gráfico ilustrativo da incidência da inflamação uterina nos grupos de éguas inseminadas com ejaculados com e sem plasma seminal

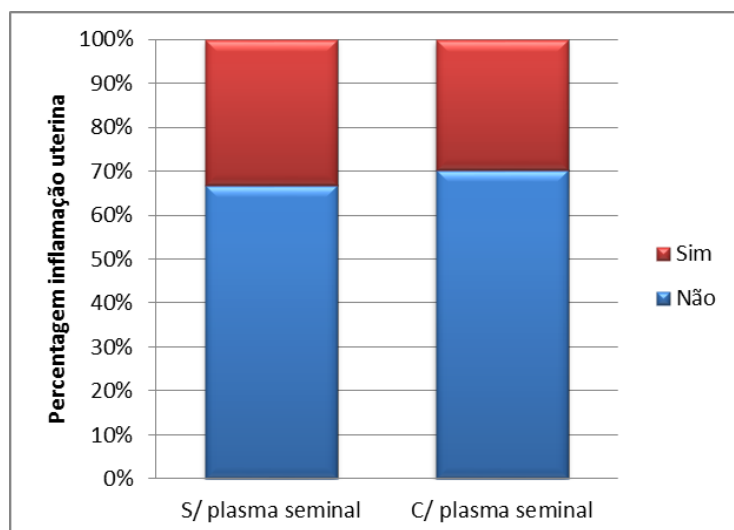


Tabela 3 – Número de inseminações efectuadas com e sem plasma seminal e a sua relação com o desenvolvimento da inflamação uterina após IA

Inflamação uterina	S/ plasma seminal	C/ plasma seminal
Não	4	26
Sim	2	11

#### Momento da IA:

Durante este estudo foi realizada apenas uma inseminação artificial pós-ovulatória, que resultou no desenvolvimento de líquido intra-uterino de reacção inflamatória. Não se observou uma relação estatística significativa entre o momento da IA e o desenvolvimento de inflamação uterina 24 horas após IA ( $p>0,05$ ).

#### Técnica de IA:

Em 93,02% ( $n=40$ ) das inseminações foi adoptada a inseminação clássica no corpo uterino enquanto que a inseminação intracornual profunda foi realizada em 6,98% ( $n=3$ ) dos casos. Como se pode observar na tabela 4, 32,5% ( $n=13$ ) das IAs com deposição do sémen no corpo uterino apresentaram sinais ecográficos e citológicos compatíveis com uma reacção inflamatória uterina pós-inseminatória. Nenhuma das inseminações intracornuais profundas resultaram numa resposta inflamatória uterina (Figura 28 e Tabela 4). Apesar de tudo, estes resultados não traduzem uma possível influência deste factor no desenvolvimento da resposta inflamatória uterina após IA ( $p>0,05$ ).

Figura 28 – Gráfico ilustrativo da incidência da inflamação uterina nos grupos de éguas inseminadas com recurso à inseminação intracornual profunda e no corpo uterino

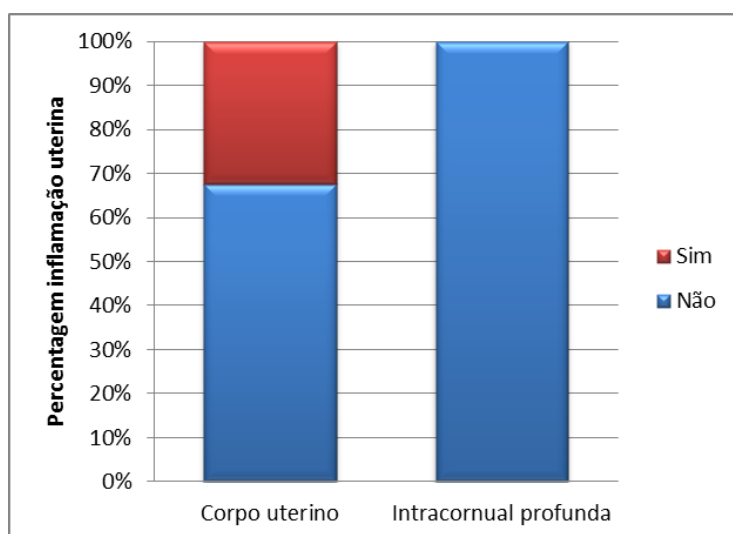


Tabela 4 – Número de inseminações efectuadas no corpo uterino e intracornuais profundas e a sua relação com o desenvolvimento da inflamação uterina após IA.

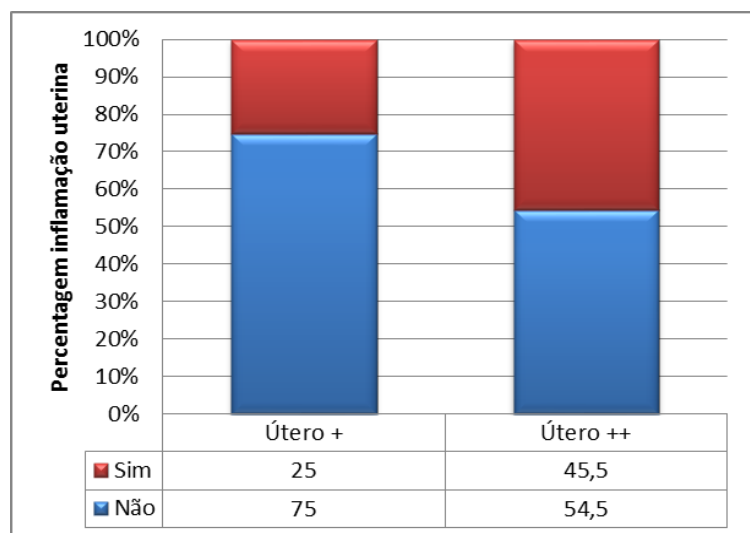
Inflamação uterina	Corpo uterino	Intracornual profunda
Não	27	3
Sim	13	0

#### Características do útero antes da IA:

De todas as características observadas durante a monitorização ecográfica das éguas, neste trabalho foi dado especial ênfase à presença e magnitude do edema uterino antes da IA. O edema uterino foi classificado como normal (+) ou anormal (++ ou +++). Neste pequeno estudo todos os casos de edema uterino anormal foram classificados como sendo de grau ++. Este edema verificou-se estar presente em 25,6% (n=11) das inseminações.

Em 74,4% (n=32) das inseminações as éguas apresentavam um edema uterino considerado normal (+) antes da IA. Destas, 25% (n=8) apresentaram uma reacção inflamatória uterina à inseminação. Já nas éguas com edema uterino ++ a incidência da resposta inflamatória uterina após IA foi 45,45% (n=5). É de salientar o facto de a percentagem de inseminações que não resultaram numa inflamação uterina ser inferior no grupo das éguas com edema uterino anormal (Figura 29).

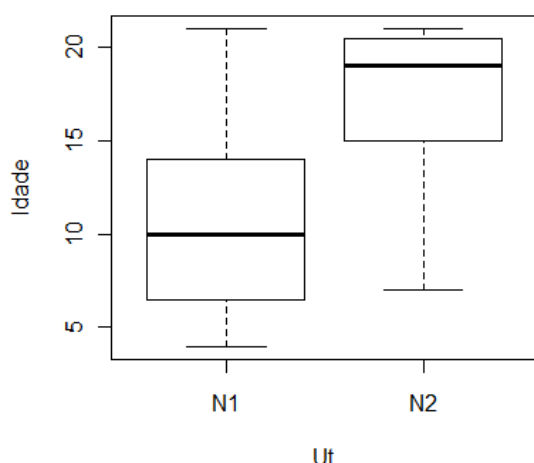
Figura 29 – Representação gráfica da relação obtida entre o edema uterino antes da IA e o desenvolvimento da inflamação uterina pós-inseminatória



Estes resultados não aparentam reflectir a influência desta variável na resposta inflamatória uterina pós-inseminatória ( $p>0,05$ ).

Pôde ainda constatar-se que a média das idades das éguas que apresentaram edema uterino grau ++ ( $\bar{x}$ =16 anos) é bastante superior à média de idades do grupo de éguas que apresentaram edema uterino de grau + imediatamente antes da IA ( $\bar{x}$ =10 anos). Também a mediana de ambos os grupos é díspar, sendo respectivamente de 10 e 19 anos para as éguas com edema uterino + (N1 no gráfico) e para as éguas com edema uterino grau ++ (N2 no gráfico), respectivamente (Figura 30).

Figura 30 – Gráfico ilustrativo da relação entre a idade e o grau de edema uterino antes da IA.



Legenda: N1 – edema uterino grau +; N2 – edema uterino grau ++; Ut - útero

Consultando a mesma figura pode ainda verificar-se que efectivamente a grande maioria das éguas que possuíam edema uterino ++ eram mais velhas que as éguas com edema uterino + após IA. Estes resultados reflectem uma relação estreita entre a idade das éguas e o edema uterino antes da ovulação ( $p=0,026$ ).

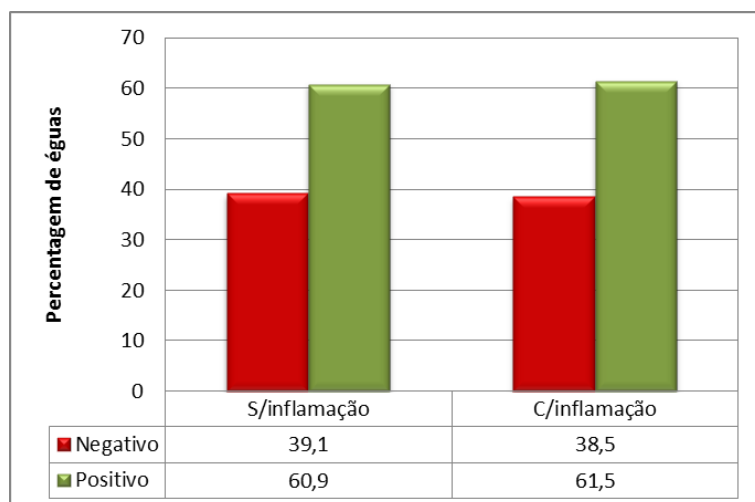
### Concepção:

Neste pequeno estudo foi também avaliada a influência dos vários parâmetros anteriormente referidos sobre a taxa de concepção.

Globalmente foi obtida uma taxa de concepção de 81,5% ( $n=22$ ).

Posto isto avaliou-se então a influência da inflamação uterina na capacidade de concepção da égua. Como se pode observar na figura 31, a percentagem de éguas com diagnóstico de gestação (DG) positivo e com DG negativo foi semelhante para os grupos de éguas com e sem inflamação uterina após IA. Desta forma pode concluir-se que aparentemente estes resultados não apresentam significância estatística ( $p>0,05$ ).

Figura 31 – Representação gráfica da relação entre o DG e a presença ou ausência de uma inflamação uterina após IA



#### 4. Discussão

Este estudo foi desenvolvido com o intuito de contribuir para a avaliação da influência de seis parâmetros distintos no estabelecimento de uma resposta inflamatória uterina após inseminação artificial e a influência desta inflamação uterina na taxa de concepção.

A inflamação uterina foi caracterizada pela presença de líquido inflamatório intrauterino 24 horas após inseminação, detectado ecograficamente, e pela presença de células inflamatórias (PMNs) em citologias dos líquidos de lavagem uterina. Foi adoptada esta técnica de obtenção de amostras endometriais para citologia porque, tratando-se de um estudo desenvolvido paralelamente às actividades clínicas do quotidiano do Médico Veterinário residente, as éguas com suspeita de presença de líquido intra-uterino induzido pela inseminação eram invariavelmente submetidas a uma lavagem uterina para eliminação dos subprodutos inflamatórios remanescentes quando decorridas 24 horas. Este procedimento demonstrou ser de grande importância no diagnóstico e tratamento de endometrites induzidas pela inseminação e, consequentemente, na obtenção de uma boa taxa de fertilidade.

Após tratamento da informação obtida, verificou-se que a média de idades das éguas que desenvolveram inflamação uterina após IA ( $\bar{x}$ =13 anos) é ligeiramente superior à observada para o grupo de éguas que não desenvolveram esta mesma inflamação ( $\bar{x}$ =11 anos). Efectivamente, a grande maioria das éguas com inflamação uterina após inseminação tinham uma idade ligeiramente superior à das éguas sem inflamação uterina. Estes resultados são suportados pelas conclusões obtidas por autores como Nikolakopoulos e Watson (1999), Troedsson (1999) e Lu e Morresey (2006), autores estes que defendem que

éguas mais velhas apresentam uma maior incidência da inflamação uterina após IA do que éguas mais novas. Éguas mais velhas e múltiparas são mais susceptíveis a apresentarem falhas dos mecanismos de defesa uterina responsáveis pela eliminação dos antigénios (espermatozóides e bactérias) e produtos inflamatórios do útero. Para tal contribuem possivelmente vários factores, incluindo a diminuição da actividade eléctrica miométrial devido a um defeito contráctil intrínseco do miométrio e a presença de alterações anatómicas do tracto reprodutivo. Éguas mais velhas e múltiparas possuem um útero mais flácido e relaxado que se estende cranialmente ao bordo pélvico dificultando a eliminação do líquido inflamatório via cérvix. Também as alterações vasculares degenerativas da parede uterina, as alterações na circulação linfática, a ausência de relaxamento do cérvix durante o estro, que prejudica a eliminação da contaminação e produtos inflamatórios uterinos resultantes da cobertura/ inseminação, e o défice de contracção cervical durante o diestro, que predispõe ao desenvolvimento de urómetra, pneumo-útero ou à contaminação fecal, são importantes contributos para o uma maior predisposição das éguas mais velhas para desenvolverem uma inflamação uterina após IA. Estas alterações são muito menos prováveis de ocorrer em éguas jovens e nulíparas.

Efectivamente, das éguas jovens e nulíparas monitorizadas, apenas uma desenvolveu uma reacção inflamatória uterina após inseminação artificial. No entanto, esta resposta pode não ser consequência de uma disfunção uterina adquirida ou congénita mas sim de factores extrínsecos. Uma hipótese será a presença de uma maior contaminação do ejaculado e/ou a uma higiene menos eficaz da zona perineal no caso de éguas inseminadas em extensivo que pode ter comprometido a higiene de todo o procedimento de IA. O sémen utilizado nesta IA foi recolhido num local com piso arenoso, o que aumenta a possibilidade de contaminação do sémen por microrganismos, poeiras e outros detritos. Neste caso o sémen apresentava uma coloração acinzentada compatível com um ejaculado mais conspurcado.

Contudo a percentagem de inseminações efectuadas em éguas com 15 ou mais anos que resultaram em inflamação uterina, não difere significativamente da percentagem obtida para as inseminações de éguas com idade inferior a 15 anos. Estes resultados podem ser explicados pelo reduzido volume da amostra estudada. Hipoteticamente pode também indicar que estas alterações das características uterinas que provocam um aumento da predisposição para o desenvolvimento de uma inflamação uterina após IA, podem ser mais comuns em éguas com uma idade mais avançada e não com idade a partir 15 anos.

Para se obter um resultado mais conclusivo e estatisticamente significativo seria necessário aumentar o número de éguas em estudo bem como o número de inseminações a analisar.

Foi também avaliada a influência do estado reprodutivo da égua antes da IA no estabelecimento de uma resposta inflamatória uterina após IA. Aqui constatou-se que o



grupo de éguas recém-paridas apresentava uma percentagem de inflamação uterina após IA semelhante à obtida para o grupo das éguas nulíparas.

O grupo das éguas alfeiras foi o grupo que apresentou a menor percentagem de éguas com inflamação uterina pós-inseminatória (18,8%).

A maior percentagem de éguas recém-paridas com inflamação uterina após IA pode ser justificada não só pelo facto de o útero dessas éguas poder não estar completamente envolvido e recuperado estruturalmente aquando da IA, como também pelo facto de o ambiente uterino estar bastante mais contaminado como resultado do parto. Esta justificação aplica-se principalmente às éguas inseminadas no cio do poldro

Por outro lado, a percentagem de inflamação uterina após IA obtida nas éguas nulíparas pode ser justificada pelo facto de ser a primeira vez que o seu útero foi manipulado e entrou em contacto com um ejaculado, podendo assim representar um estímulo quimiotático superior quando comparado com a inseminação de éguas múltíparas, cujos úteros já foram anteriormente manipulados e expostos ao sémen. Já os resultados obtidos para o grupo das éguas alfeiras são passíveis de ser justificados pelo facto de o útero destas éguas ter permanecido durante pelo menos um ano em repouso sem que tenha sido manipulado, encontrando-se portanto plenamente preparado para receber novas cobrições/inseminações.

Contudo, estes resultados não são significativos, não revelando uma possível influência do estado reprodutivo da égua na resposta inflamatória uterina após IA. Para tal seria necessária uma amostra de maiores dimensões.

No presente estudo, verificou-se que não existe grande discrepância na reacção inflamatória de éguas inseminadas com sémen fresco (29,2%) ou sémen refrigerado (33,3%). Efectivamente, todos os ejaculados foram diluídos com o mesmo diluidor de base de leite (INRA-96®), obtidos segundo o mesmo método de recolha (vagina artificial), variando apenas a diluição (1:1 para sémen fresco e 1:3 para sémen refrigerado) e o método de armazenamento, o que sugere que, aparentemente, nem a proporção de diluidor num inseminado nem a refrigeração afectam o estabelecimento de uma resposta inflamatória uterina pós-inseminatória. Infelizmente foi apenas realizada uma IA com sémen congelado, o que não é suficiente para permitir tirar qualquer conclusão sobre a sua influência na incidência da reacção inflamatória uterina ou estabelecer uma comparação com os resultados obtidos com sémen fresco ou refrigerado. Esta inseminação não induziu o desenvolvimento de uma resposta inflamatória uterina. Os resultados obtidos não nos permitem tirar uma conclusão significativa devido ao tamanho extremamente reduzido da amostra analisada.

Quando se procedeu à análise dos dados relativos à influência do plasma seminal na indução de uma resposta inflamatória uterina após inseminação, verificou-se que 29,7% dos ejaculados submetidos a centrifugação provocaram uma inflamação uterina após inseminação. Tais resultados não diferem significativamente dos obtidos para ejaculados com a totalidade do plasma seminal, para os quais foi obtida uma percentagem de resposta inflamatória em 33,3% das inseminações.

Os vários estudos realizados até ao momento sobre este assunto apresentam informações contraditórias mostrando que o plasma seminal possui propriedades imunossupressoras *in vitro*. No entanto, em todos os estudos *in vivo*, foi demonstrado que a sua infusão no útero é responsável por um aumento do número de PMNs no lúmen uterino. Para além disso, embora a presença de plasma seminal numa dose inseminante não reduza a magnitude da inflamação induzida por uma inseminação, aparenta reduzir a sua duração, sendo obtido um número de PMNs muito superior às 6 e 12 horas do que às 24 horas após IA (Troedsson *et al*, 2001). Foi também descoberto que o componente responsável pela supressão imunitária induzida pelo plasma seminal consiste numa molécula proteica de baixo peso molecular que se liga aos espermatozóides, protegendo-os contra a fagocitose (Troedsson *et al*, 2001, Alghamdi *et al*, 2004).

Então, contrariamente ao verificado, seria de esperar que as éguas inseminadas com os ejaculados com a totalidade do plasma seminal apresentassem uma maior proporção de éguas com reacção positiva que o grupo de éguas inseminadas com ejaculados centrifugados. Os resultados obtidos podem ser explicados pelo facto de as amostras terem sido recolhidas mais tardiamente, 24 horas após inseminação, e nesse momento a resposta inflamatória na presença de plasma seminal estar numa fase de resolução mais avançada. Consequentemente, iria haver uma redução do número de éguas com diagnóstico de inflamação uterina no grupo inseminado com ejaculados com a totalidade do plasma seminal.

Pode também dar-se o facto de a centrifugação não eliminar as proteínas seminais imunossupressoras, possivelmente porque o simples contacto do plasma seminal com os espermatozóides durante a ejaculação é suficiente para que as proteínas protectoras se liguem a estes. Tal afirmação aparentemente sustenta os resultados obtidos pois, neste caso, não haveria diferenças na resposta inflamatória uterina à inseminação por parte de ambos os grupos.

A discrepância entre o número de inseminações realizadas com sémen inteiro e com sémen centrifugado pode também, de algum modo, ter influenciado os resultados obtidos. Mais uma vez que os resultados obtidos não são estatisticamente significativos, seriam necessárias mais amostras para que fosse possível retirar alguma conclusão sobre a possível influência deste parâmetro na resposta inflamatória uterina após inseminação.

Novamente, o tamanho reduzido da amostra não permitiu que fosse analisada uma possível influência do momento da IA na indução da resposta inflamatória. Foi realizada apenas uma inseminação artificial pós-ovulatória que resultou numa inflamação uterina após inseminação. Seria de esperar que inseminações pós-ovulatórias predispussem a uma reacção inflamatória uterina como consequência de um aumento da progesterona poucas horas após ovulação, pois esta hormona tem a capacidade de suprimir os mecanismos de defesa imunitários e mecânicos do útero. No entanto, estudos recentes revelam que não existe qualquer influência significativa deste factor na resposta inflamatória uterina 12 horas após inseminação artificial com sémen congelado (Watson *et al*, 2001).

Neste estudo foram também realizadas 3 inseminações intracornuais profundas (6,98%), o que contrasta com o número bem mais elevado de inseminações efectuadas no corpo uterino (93,02%, n=40), o que por si só é um factor que impede a comparação da influência de ambas as técnicas no estabelecimento de uma resposta inflamatória uterina. Anteriormente pensava-se que as inseminações intracornuais profundas eram responsáveis pelo estabelecimento de inflamações uterinas mais severas que as inseminações efectuadas no corpo uterino. Estes estudos foram recentemente contestados por Güvenc *et al* (2005), que não verificaram qualquer diferença significativa na reacção inflamatória uterina entre ambos os locais de deposição, sugerindo que a manipulação e introdução da ponta da pipeta de inseminação na ponta do corno uterino não constitui um estímulo irritante adicional para o útero.

As inseminações intracornuais profundas foram efectuadas tanto com sémen congelado (n=1) como com sémen fresco (n=2) e todos os inseminados apresentavam volumes reduzidos (3 e 10mL) com número de espermatozóides aproximadamente idêntico ( $600 \times 10^6$ ). Este factor poderia predispor ao desenvolvimento de uma maior resposta inflamatória uterina pois está comprovado que volumes menores de sémen com maior concentração de espermatozóides constituem um estímulo quimiotático superior quando comparado com ejaculados mais volumosos e menos concentrados. No entanto, nenhuma destas inseminações induziu uma resposta inflamatória uterina, o que pode sugerir que a manipulação adicional efectuada com esta técnica não condiciona o estabelecimento de uma resposta inflamatória uterina. No entanto estes resultados não são estatisticamente significativos, sendo também necessário um maior número de amostras para que seja possível chegar a uma conclusão mais válida.

Foi ainda analisado se o grau de edema uterino seria passível de influenciar a resposta inflamatória uterina após inseminação. 45,5% das inseminações realizadas em éguas cujo útero demonstrava edema uterino de grau ++ imediatamente antes da IA, induziram uma

resposta inflamatória uterina, o que contrasta com os 25% obtidos após IA de éguas com edema uterino de menor intensidade, grau +. O edema, embora seja um achado fisiológico, pode tornar-se excessivo se a inflamação persistir ou se verificar a presença de uma alteração na drenagem venosa devido à uma degenerescência da vasculatura endometrial ou a uma disfunção da circulação linfática. Os vasos linfáticos podem não ser capazes de drenar este excesso de edema levando à formação de lacunas linfáticas. Desenvolve-se então um ciclo vicioso em que o endométrio é irritado e há uma acumulação contínua de fluido no lúmen ou de edema nas paredes uterinas (LeBlanc, 2003). Estas alterações encontram-se presentes principalmente em éguas velhas e múltiparas.

Após tratamento dos dados foi possível verificar que a média de idade das éguas que apresentavam um edema uterino mais exuberante ( $\bar{x}$ =16 anos), era bastante superior à verificada para o grupo de éguas com edema uterino + antes da IA ( $\bar{x}$ =10 anos), e que, a grande maioria das éguas com edema uterino ++ eram bastante mais velhas que as éguas com edema uterino +. Estes resultados sugerem que a idade influencia o grau de edema presente antes da ovulação e da IA ( $p=0,026$ ). Assim sendo, o maior edema verificado imediatamente antes da inseminação pode efectivamente ser resultado de uma disfunção da circulação linfática ou da degenerescência da vasculatura venosa endometrial, com consequente drenagem deficiente do edema da parede uterina e do fluido intra-uterino fisiologicamente induzido pela inseminação artificial. Esta condição será então suficiente para que o grupo de éguas com edema uterino anormal apresente uma maior percentagem de resposta inflamatória uterina após inseminação quando comparado com o grupo das éguas com edema uterino menos pronunciado antes da inseminação.

Por fim foi avaliada a influência da inflamação uterina na taxa de concepção, tendo-se obtido taxas de concepção muito semelhantes para éguas com inflamação uterina (61,5%) e sem inflamação uterina após IA (60,9%). Tais resultados revelam que possivelmente a grande maioria das éguas que apresentaram uma resposta inflamatória uterina foram capazes de eliminar os subprodutos pró-inflamatórios e os agentes agressores presentes no lúmen uterino após IA, permitindo assim o restabelecimento de um ambiente uterino adequado para receber o conceito. Podem também demonstrar que a terapêutica instituída a todas éguas com inflamação uterina após IA, incluindo a lavagem uterina com uma solução salina estéril, a administração endovenosa de ocitocina e a aplicação de antibióticos intrauterinos nos casos éguas onde se comprovou existir uma endometrite bacteriana, foi bem sucedida. Este facto permitiu aumentar a taxa de concepção destas éguas aproximando estes resultados aos obtidos em éguas sem inflamação uterina 24 horas após IA.

## 5. Conclusão

Nenhum dos resultados obtidos neste pequeno estudo foi estatisticamente significativo, não permitindo por isso tirar qualquer conclusão definitiva sobre a influência da idade e estado reprodutivo da égua, do tipo de sêmen, da presença de plasma seminal, do momento e da técnica de inseminação artificial, e das características do útero antes da inseminação no estabelecimento da resposta inflamatória uterina após inseminação. Não foi também possível concluir sobre quais as repercussões desta inflamação uterina na concepção. Este facto deveu-se essencialmente à escassez de amostras analisadas.

No entanto, foram obtidos resultados significativos que permitem afirmar que éguas mais velhas são mais susceptíveis a apresentar graus de edema uterino superiores antes da ovulação, podendo ser este edema resultado de uma alteração da drenagem vascular devido à uma degenerescência da vasculatura venosa endometrial ou a uma disfunção da circulação linfática, alterações estas que são mais frequentes em éguas mais velhas e multíparas.

Contudo, os conhecimentos teóricos adquiridos na realização deste documento permitem fazer um conjunto de considerações tendo em conta a informação conhecida actualmente sobre a influência destes factores na resposta inflamatória uterina após IA.

Desta forma, pode afirmar-se que:

- Éguas mais velhas e multíparas aparentam-se mais predispostas a desenvolverem uma resposta inflamatória uterina após inseminação artificial do que éguas jovens, possivelmente devido a uma falha dos mecanismos físicos e mecânicos de defesa uterina.
- A resposta inflamatória uterina que ocorre após inseminação aparenta ser independente da forma como o sêmen é processado.
- A presença de plasma seminal também não aparenta ser um factor fulcral para o desenvolvimento de uma resposta inflamatória uterina, provavelmente porque a centrifugação não elimina as proteínas seminais de actividade imunossupressora.
- A presença de edema uterino mais exuberante próximo da ovulação pode dever-se a uma falha na drenagem linfática e venosa da parede uterina, aparentando ser igualmente um factor de predisposição para a indução de uma resposta inflamatória uterina após inseminação, particularmente em éguas velhas e multíparas.
- Aparentemente nem o momento nem a técnica de IA influenciam o desenvolvimento ou a severidade de uma resposta inflamatória uterina.
- A inflamação uterina após IA, desde que devidamente tratada, não influencia a taxa de concepção.

Embora seja uma ferramenta importante na detecção de uma resposta inflamatória, o valor da citologia endometrial está limitado à comprovação de uma resposta inflamatória activa, não detectando alterações inflamatórias mais subtis como nos casos de endometrite crónica, nem permitindo a identificação de um agente etiológico. Então, teria sido importante confrontar os resultados dos exames citológicos com resultados de uma biópsia endometrial e/ou de uma cultura uterina para que fossem obtidas mais e melhores informações. No entanto, tal não foi possível não só devido à actual conjuntura económica nacional, mas também porque, sendo a Lusopecus Lda. uma empresa de prestação de serviços médico-veterinários, a prioridade foi sempre maximizar a fertilidade e reduzir ao máximo os gastos por égua. Desta forma, um maior número de manipulações e procedimentos invasivos poderiam ter sido prejudiciais ao cumprimento dos propósitos dos serviços prestados.

Embora tenham sido muitos os estudos desenvolvidos com o intuito de estudar esta temática, são ainda muito poucos os que resultaram em conclusões fortes sobre a influência dos vários factores na resposta inflamatória uterina. Portanto, são necessário ainda mais estudos para que no futuro se consiga aprofundar os actuais conhecimentos e descobrir novas informações sobre estes fenómenos.

## BIBLIOGRAFIA

Aguilar, J., Hanks, M., Shaw, D.J., Else, R., Watson, E. (2006). Importance of using guarded techniques for preparation of endometrial cytology smears in mares, *Theriogenology*, 66, 423-430.

Alghamdi, A.S., Foster, D.N., Troedsson, M.H.T. (2004), Equine seminal plasma reduces sperm binding to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and improves the fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri. *Reproduction*, 127, 593-600.

Alghamdi, A.S., Foster, D.N. (2005). Seminal Dnases frees spermatozoa entangled in neutrophil extracellular traps, *Biology of Reproduction*, 73, 1174-1181.

Alghamdi, A.S., Lovaas, B., Bird, S.L., Lamb, G.C., Rendahl, A.K., Taube, P.C., Foster, D.N. (2009). Species-specific interaction of seminal plasma on sperm-neutrophil binding, *Animal Reproduction Science*, 114, 331-344.

Aurich, C. (2011). Semen extenders for cooled semen (europe). In A.O. McKinnon, E.L. Squires, W.E. Vaala, D.D. Varner (Eds), *Equine Reproduction* (2<sup>nd</sup> ed.), (pp. 1336-1339), Oxford, UK; Blackwell Publishing Ltd.

Ax, R.L., Dally, M.R., Didion, B.A., Lenz, R.W., Love, C.C., Varner, D.D., Hafez, B., Bellin, M.E. (2004). Artificial insemination. In B. Hafez, E.S.E. Hafez, *Reproduction in farm animals* (7<sup>th</sup> ed.), (pp. 381-394), Baltimore, Maryland, USA: Lippincott Williams & Wilkins

Barbacini, S., Necchi, D., Zavaglia, G., Squires, E.L. (2003). Retrospective study on the incidence of postinsemination uterine fluid in mares inseminated with frozen/thawed semen, *Journal of Equine Veterinary Science*, 23, 493-496

Bearden, H.J. Fuquay, J.W. (1998). *Applied animal reproduction* (6<sup>th</sup> ed.). Upper Saddle River, USA: Prentice-Hall.

Bergfelt, D.R. (2009). Anatomy and physiology of the mare In J.C. Samper (Ed), *Equine breeding management and artificial insemination*, (2<sup>nd</sup> ed.), (pp. 113-131), St. Louis, Missouri: Saunders

Blanchard T.L., Varner, D.O., Schumacher, J., Love, C.C., Brinsko, S.P., Rigby, S.L. (Eds) (2003). *Manual of equine reproduction* (2<sup>nd</sup> ed.), (cap. 4, 5, e 12), Philadelphia, PA, USA: Mosby Inc.

Bowman, T.R. (2011). Direct rectal palpation. In A.O. McKinnon, E.L. Squires, W.E. Vaala, D.D. Varner (Eds), *Equine Reproduction* (2<sup>nd</sup> ed.), (pp. 1904-1913), Oxford, UK; Blackwell Publishing Ltd.

Brito, L.F.C. (2007). Evaluation of stallion sperm morphology, *Clinic Techniques in Equine Practice*, 6, 249-264.

Campbell, M.L.H., England, G.C.W. (2006). The effect of coitus and artificial insemination of different volumes of fresh semen on uterine contractions in the mare, *Animal Reproduction Science*, 94, 248-251.

Card, C. (2005). Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares, *Theriogenology*, 64, 580-588.

Carleton, C.L. (2007). Clinical examination of the nonpregnant equine female reproductive tract. In R.S. Youngquist & W.R. Threlfall, *Current therapy in large animal theriogenology*, (2<sup>nd</sup> ed.). (pp. 74-90). St. Louis, Missouri: Saunders

Dell'Aqua Jr, J.A., Papa, F.O., Lopes, M.D., Alvarenga, M.A., Macedo, L.P., Melo, C.M. (2006). Modulation of acute uterine inflammatory response after artificial insemination with equine frozen semen, *Animal Reproduction Science*, 94, 270-273.

Carnevale, E.M., Olsen, L.M. (2011). Normal anatomy. In A.O. McKinnon, E.L. Squires, W.E. Vaala, D.D. Varner (Eds), *Equine Reproduction* (2<sup>nd</sup> ed.), (pp. 2003-2008), Oxford, UK; Blackwell Publishing Ltd.

Costa, L. (2008). Apontamentos teóricos da disciplina de Reprodução e Obstetrícia I. Lisboa – Faculdade de Medicina Veterinária

Eddy, E.M. (2006). The spermatozoon. In J.D. Neill (Ed.), *Knobil and Neill's physiology of reproduction* (3<sup>rd</sup> ed.). (pp. 1-54), St. Louis, Missouri, Elsevier Academic Press

England, G.C.W. (2005). *Fertility and obstetrics in the horse*. (3<sup>rd</sup> ed.). Oxford: Blackwell Science Ltd, Blackwell Publishing

Fiala, S.M.E., Pimente, C.A., Steiger, K., Mattos, A.L.G., Gregory, R.M., Mattos, R.C. (2002). Effect of skim milk and seminal plasma in uterine infusion in mares, *Theriogenology*, 6657, 1-4.

Fiala, S.M.E. (2004). *Transporte espermático e resposta inflamatória na égua após a inseminação com diferentes concentrações de espermatozoides*. Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Porto Alegre: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Federal do Rio Grande Sul.

Fiala, S.M.E., Pimentel, C.A., Mattos, A.L.G., Gregory, R.M., Mattos, R.C. (2007). Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare, *Theriogenology*, 67, 556-562.

Fumuso, E., Aguilar, J., Giguère, S., David, O., Wade, J., Rogan, D. (2006). Interleukin-8 (IL-8) and 10 (IL-10) mRNA transcriptions in the endometrium of normal mares and mares susceptible to persistent post-breeding endometritis, *Animal Reproduction Science*, 94, 282-285.

Garner, D.L., Hafez, E.S.E. (2004). Spermatozoa and seminal plasma. In B. Hafez, E.S.E. Hafez, *Reproduction in farm animals* (7<sup>th</sup> ed.), (pp. 97-110), Baltimore, Maryland, USA: Lippincott Williams & Wilkins

Güvenc, K., Reilas, T., Katila, T. (2005). Effect of insemination dose and site on uterine inflammatory response of mares, *Theriogenology*, 63, 2504-2512.

Kainer, R.A. (2011). Internal reproductive anatomy. In A.O. McKinnon, E.L. Squires, W.E. Vaala, D.D. Varner (Eds), *Equine Reproduction* (2<sup>nd</sup> ed.), (pp. 1582-1597), Oxford, UK; Blackwell Publishing Ltd.

Kareskoski, M., Katila, T. (2008). Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity, *Animal Reproduction Science*, 107, 249-256.

Katila, T. (1996). Uterine defence mechanisms in the mare. *Animal Reproduction Science*,



42, 197-204.

Katila, T. (2001). Sperm-uterine interactions: a review, *Animal Reproduction Science*, 68, 267-272.

Katila, T. (2005). Effect of the inseminate and site of insemination on the uterus and pregnancy rates of mares, *Animal Reproduction Science*, 89, 31-38.

LeBlanc, M.M. (2003), Persistent mating induced endometritis in the mare: pathogenesis, diagnosis and treatment, in Ball B.A. ed.: *Recent Advances in Equine Reproduction*, Ithaca, NY, USA, International Veterinary Information Services.

LeBlanc, M.M. (2011). Uterine cytology. In A.O. McKinnon, E.L. Squires, W.E. Vaala, D.D. Varner (Eds), *Equine reproduction*, (2<sup>nd</sup> ed.), (pp. 1922-1928), Oxford, UK; Blackwell Publishing Ltd.

Lewis, G.S. (2004). Steroidal regulation of uterine immune defenses, *Animal Reproduction Science*, 82-83, 281-294.

Ley, W.B. (2004). *Broodmare reproduction for the equine practitioner*, Jackson, WY: Teton NewMedia

Liepina, E., Alamo, M.M.R., Reilas, T., Katila, T. (2010). IL-6 and TNF- $\alpha$  expression in uterine fluids of mares with induced delay in uterine clearance, *Animal Reproduction Science*, 121S, S107-S108.

Love, C.C. (2011). Endometrial biopsy. In A.O. McKinnon, E.L. Squires, W.E. Vaala, D.D. Varner (Eds), *Equine Reproduction* (2<sup>nd</sup> ed.), (pp. 1929-1939), Oxford, UK; Blackwell Publishing Ltd.

Lu, K.G., Morressey, P.R. (2006). Reproductive tract infections in horses, *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 22, 519-552.

Mackay, R.J. (2000). *Inflammation in horses*. Veterinary clinics of north america: equine practice, 16, 15-27.

Malschitzky E., Jobim, M.I.M., Gregory, R.M., Mattos, R.C. (2007). *Endometrite na égua, novos conceitos*, Revista brasileira de reprodução animal, 31, 17-26

McKinnon, A.O., McCue, P.M. (2011). Uterine Abnormalities. In A.O. McKinnon, E.L. Squires, W.E. Vaala, D.D. Varner (Eds), *Equine reproduction*, (2<sup>nd</sup> ed.), (pp. 2137-2161), Oxford, UK; Blackwell Publishing Ltd.

Meyers, S.A. (2009). Sperm physiology. In J.C. Samper (Ed), *Equine breeding management and artificial insemination*, (2<sup>nd</sup> ed.), (pp. 47-55), St. Louis, Missouri: Saunders

Morel, M.C.G.D. (Ed). (1999). *Equine artificial insemination*. Wallingford, Oxon, UK. CAB International, CABI Publishing

Morel, M.C.G.D. (Ed). (2003). *Equine reproductive physiology, breeding and stud management*. (2<sup>nd</sup> ed.), (cap 1, 11 e.20). Wallingford, Oxon, UK. CAB International, CABI Publishing

Nash, D.M., Sheldon, I.M., Herath, S., Lane, E.A. (2010). Markers of the uterine innate

immune response of the mare, *Animal Reproduction Science*, 119, 31-39.

Nielsen, J.M. (2005). Endometritis in the mare: A diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy, *Theriogenology*, 64, 510-518.

Nikolakopoulos, E., Watson, E.D. (1997), Does artificial insemination with chilled, extended semen reduce the antigenic challenge to the mare's uterus compared with natural service?, *Theriogenology*, 47, 583-590.

Nikolakopoulos, E., Watson, E.D. (1999), Uterine contractility is necessary for the clearance of intrauterine fluid but not bacteria after bacterial infusion in the mare, *Theriogenology*, 52, 413-423.

Overbeck, W., Witte, T.S., Heuwieser, W. (2011), Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares, *Theriogenology*, 75, 1311-1318.

Palm, F., Walter, I., Budik, S., Aurich, C. (2006). Influence of different semen extenders and seminal plasma on the inflammatory response of the endometrium in oestrus mares, *Animal Reproduction Science*, 94, 286-289.

Palm, F., Walter, I., Budik, S., Kolodziejek, J., Nowotny, Aurich, C. (2008). Influence of different semen extenders and seminal plasma on PMN migration and on expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and COX-2 mRNA in the equine endometrium, *Theriogenology*, 70, 843-851.

Peterson, R. (2011). *Normal mare anatomy*. Acedido em 16 de Setembro de 2011. Disponível em <http://www.thehorse.com/images/content/0703/repro.html>

Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A. (Eds). (2005). *Microbiology*. 6<sup>th</sup> ed., New York USA. McGraw-Hill. McGraw-Hill Companies Inc.

Pycock, J.F. (2011). Ultrasonography. In A.O. McKinnon, E.L. Squires, W.E. Vaala, D.D. Varner (Eds), *Equine reproduction* (2<sup>nd</sup> ed.), (pp. 1914-1921), Oxford, UK; Blackwell Publishing Ltd.

Riddle, W.T., LeBlanc, M.M., Stromberg, A.J. (2007). Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a throughbred practice, *Theriogenology*, 68, 395-402.

Samper, J.C. (2007). Techniques for artificial insemination. In R.S. Youngquist & W.R. Threlfall, *Current therapy in large animal theriogenology*, (2<sup>nd</sup> ed.). (pp. 37-42). St. Louis, Missouri: Saunders

Samper, J.C. (2009). Uterine edema in the mare. In J.C. Samper (Ed), *Equine breeding management and artificial insemination*, (2<sup>nd</sup> ed.), (pp. 133-138), St. Louis, Missouri: Saunders

Schlafer, D.H. (2007). Equine endometrial biopsy: enhancement of clinical value by more extensive histopathology and application of new diagnostic techniques?, *Theriogenology*, 68, 413-422.

Schuberth, H.J., Taylor, U., Zerbe, H., Waberski, D., Hunter, R., Rath, D. (2008), Immunological responses to semen in the female genital tract, *Theriogenology*, 70, 1174-1181.

Sertich, P.L. (2007) Intrauterine diagnostic procedures. In J.C. Samper, J.F. Pycock, A.O. McKinnon (Eds), *Current therapy in equine reproduction*, (pp. 36-43). St. Louis, Missouri:

Snider, T.A., Sepoy, C., Holyoak, G.R. (2011). Equine endometrial biopsy: observation, interpretation and application of histopathologic data, *Theriogenology*, 75, 1567-1581.

Taylor, F.G.R., Brazil, T.J., Hillyer, M.H. (2010). *Diagnostic techniques in equine medicine*, (2<sup>nd</sup> ed.), (cap, 7), St. Louis, Missouri: Saunders

Troedsson, M.H.T. (1999). Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare, *Theriogenology*, 52, 461-471.

Troedsson, M.H.T., Loset, K., Alghamdi, A.M., Dahms, B., Crabo, B.G. (2001). Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen, *Animal Reproduction Science*, 68, 273-278.

Troedsson, M.H.T. (2006). Breeding-induced endometritis in mares, *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 22, 705-712.

Troedsson, M.H.T. (2008). Problems after breeding, *Journal of Equine Veterinary Science*, 28, 635-639

Troedsson, M.H.T. (2011). Endometritis. In A.O. McKinnon, E.L. Squires, W.E. Vaala, D.D. Varner (Eds), *Equine Reproduction* (2<sup>nd</sup> ed.), (pp. 2608-2619), Oxford, UK; Blackwell Publishing Ltd.

Watson, E.D. (2000). Post-breeding endometritis in the mare, *Animal Reproduction Science*, 60-61, 221-232.

Watson, E.D., Barbacini, S., Berrocal, B., Sheerin, O., Marchi, V., Zavaglia, G., Necchi, D. (2001). Effect of insemination time of frozen semen on incidence of uterine fluid in mares, *Theriogenology*, 56, 123-131.

Wolfsdorf, K., Caudle, A.B. (2007). Inflammation of the tubular reproductive tract of the mare. In R.S. Youngquist & W.R. Threlfall, *Current therapy in large animal theriogenology*, (2<sup>nd</sup> ed.). (pp. 158-167). St. Louis, Missouri: Saunders